

ZUR BESTIMMUNG DES
BINDUNGSVERHALTENS VON
BISKATIONISCHEN, CHEMO-
THERAPEUTISCH AKTIVEN VERBINDUNGEN
AN DNA, INSBESONDERE MITTELS
DIFFERENTIALVERTEILUNG

*Diss. Erlangen
1983*

von
Reinhard Kolb
aus Markt Taschendorf/Mfr.



ZUR BESTIMMUNG DES
BINDUNGSVERHALTENS VON
BISKATIONISCHEN, CHEMO-
THERAPEUTISCH AKTIVEN VERBINDUNGEN
AN DNA, INSBESONDERE MITTELS
DIFFERENTIALVERTEILUNG

Den Naturwissenschaftlichen Fakultäten
der Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg

zur

Erlangung des Doktorgrades

vorgelegt von

Reinhard Kolb

aus Markt Taschendorf/Mfr.

Als Dissertation genehmigt von den
Naturwissenschaftlichen Fakultäten der Universität
Erlangen-Nürnberg

Tag der mündlichen Prüfung: 01.06.1983

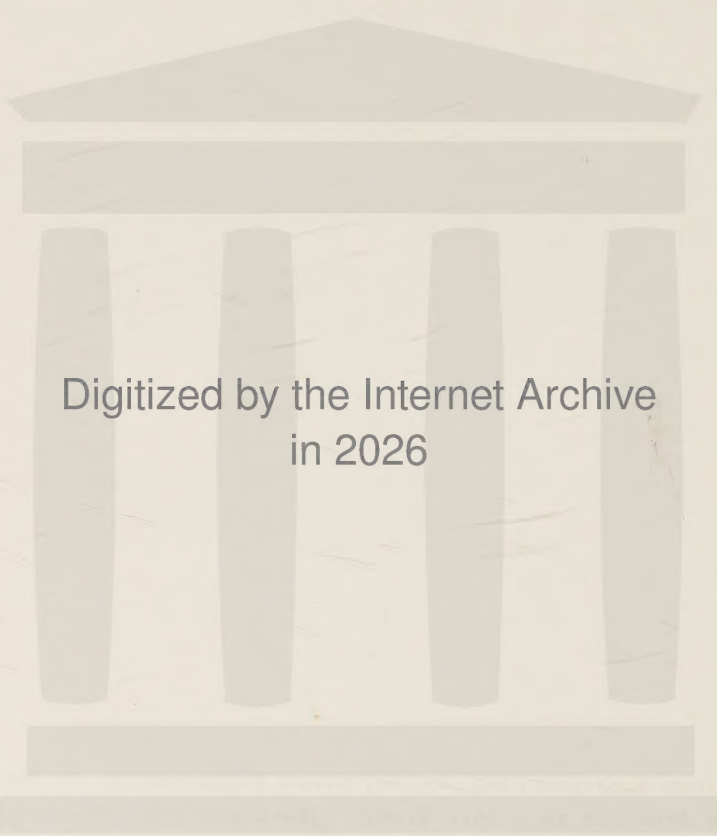
Vorsitzender der

Promotionskommission	: Professor Dr. K. Jacobs
Erstberichterstatler	: Professor Dr. O. Dann
Zweitberichterstatler	: Professor Dr. H. Hofmann

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Juni 1980 bis Dezember 1982 am Institut für Pharmazie und Lebensmittelchemie der Universität Erlangen-Nürnberg ausgeführt.

Meinem hochverehrten Lehrer, Herrn Professor Dr. O. Dann, der die Anregung zu dieser Arbeit gab, danke ich sehr herzlich für seine fördernde Unterstützung bei ihrem Fortgang und für das mir stets entgegengebrachte Verständnis.

Mein besonderer Dank gilt auch Herrn Professor Dr. W. Müller vom Max Planck-Institut für Biochemie in München für die vielseitige praktische und theoretische Unterstützung.



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546217_0016

Meinen Eltern in Dankbarkeit gewidmet

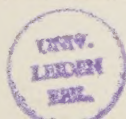
INHALTSVERZEICHNIS

Seite

Zusammenfassung.....	1
----------------------	---

A. Theoretischer Teil

1.	Ausgangspunkt und Zielsetzung der Untersuchungen	3
1.1.	Hemmstoffe der Nukleinsäuresynthese.....	3
1.1.1.	Antimetabolite.....	3
1.1.2.	Enzymhemmstoffe.....	3
1.1.3.	Matrizenfunktionshemmstoffe.....	5
1.2.	Bindungsart der Matrizenfunktionshemmstoffe....	5
1.2.1.	Kovalente Bindung.....	5
1.2.2.	Interkalation.....	6
1.2.3.	Außenanlagerung.....	8
1.3.	Anwendungsgebiete nicht interkalierender, synthetischer Verbindungen.....	11
1.3.1.	Therapie der Leukämie.....	11
1.3.2.	Therapie der Trypanosomiasis.....	15
1.3.3.	Diagnostische Anwendungsmöglichkeiten.....	16
1.4.	Zielsetzung der eigenen Untersuchungen.....	17
2.	Untersuchung von DNA-Ligand Interaktionen.....	18
2.1.	Bestimmung von Affinität und Spezifität.....	18
2.1.1.	Literaturbekannte Methoden.....	18
2.1.1.1.	UV-Titration.....	18
2.1.1.2.	Fluoreszenztitration.....	19
2.1.1.3.	Ultrazentrifugationsmethoden.....	20
2.1.1.4.	Gelfiltration.....	20
2.1.1.5.	Gleichgewichtsdialyse.....	21
2.1.1.6.	Verteilungsmethode.....	22
2.1.2.	Eigene Untersuchungen.....	23
2.1.2.1.	Gleichgewichtsdialyse.....	23
2.1.2.2.	Variationsversuche für die Dialysemembranen....	24
2.1.2.3.	Vorversuche mit anderen Methoden.....	25



2.1.2.3.1.	Ultrazentrifugation.....	25
2.1.2.3.2.	Verteilungsmethode.....	26
2.1.2.4.	Differentialverteilungsmethode.....	27
2.2.	Unterscheidung zwischen Außenanlagerung und Interkalation.....	28
2.2.1.	Gebräuchliche Methoden.....	28
2.2.2.	Eigenschaften kovalent-geschlossener, ringförmiger DNA.....	28
2.2.3.	Gelelektrophorese von kovalent-geschlossener, ringförmiger DNA.....	31
3.	Ergebnisse.....	33
3.1.	Affinität und Spezifität.....	33
3.1.1.	Spektrale Veränderungen.....	33
3.1.2.	Vergleich der Dialysiermethode mit der Differentialverteilungsmethode.....	33
3.1.2.1.	Verwendung von Hexanol-(1).....	35
3.1.2.2.	Verwendung von Oktanol-(1).....	35
3.1.3.	DNA-Affinitäten und Spezifitäten in Abhängigkeit von der chemischen Struktur.....	35
3.1.3.1.	2-Phenylindole.....	35
3.1.3.2.	Verschieden substituierte Indole.....	42
3.1.3.3.	Substituierte Benzimidazole.....	43
3.1.3.4.	Vinylverbrückte biskationische Verbindungen..	45
3.1.3.5.	Direkt verknüpfte heteroaromatische biskationische Verbindungen.....	48
3.1.4.	Bindungsverhalten von DAPI an DNA/Dextran- sulfat.....	48
3.2.	Ergebnisse der Gelelektrophorese.....	50
3.2.1.	Photographische Aufnahmen.....	50
3.2.2.	Graphische Auswertung.....	56
3.3.	Diagnostische Anwendbarkeit.....	58
3.3.1.	Fluoreszenzverhalten.....	58
3.3.2.	Photostabilität.....	66

4.	Diskussion.....	69
4.1.	Bindungsstudien.....	69
4.1.1.	Vergleich der Methoden.....	69
4.1.2.	Bindungsparameter in Abhängigkeit von der chemischen Struktur.....	71
4.1.2.1.	Affinitäten.....	71
4.1.2.2.	Spezifitäten.....	73
4.1.3.	Affinität in Abhängigkeit vom Ver- teilungskoeffizienten.....	74
4.2.	DNA-Bindung und biologische Aktivität.....	76
4.2.1.	Antileukämische Wirksamkeit.....	76
4.2.1.1.	In vitro Untersuchungen.....	76
4.2.1.2.	In vivo Untersuchungen vom NCI.....	79
4.2.2.	DNA-Bindung und trypanozide Aktivität.....	81
4.3.	Bindungsart biskationischer Verbindungen.....	84
4.4.	Diagnostische Anwendbarkeit.....	86

B. Experimenteller Teil

1.	Allgemeine Angaben.....	88
2.	Gewinnung von DNA.....	90
2.1.	Anzucht der Bakterien.....	90
2.2.	Isolation von DNA.....	91
2.2.1.	Bacillus subtilis-DNA.....	91
2.2.2.	Micrococcus luteus-DNA.....	93
2.2.3.	Dialyse der DNA-Lösungen.....	94
2.2.4.	Gehaltsbestimmung der DNA-Lösungen.....	95
2.2.5.	Alkalische Hyperchromie.....	95
3.	Gleichgewichtsdialyse.....	96
4.	Differentialverteilungsmethode.....	97
4.1.	Durchführung.....	97
4.1.1.	Aufbau der Kammer.....	97

4.1.2.	Ausführung.....	99
4.2.	Theoretische Grundlagen der Auswertung.....	101
4.2.1.	Spezifität.....	101
4.2.2.	Affinität.....	102
4.3.	Berechnungsbeispiel.....	104
4.4.	Variation der Auswertungsmethode.....	108
5.	Gelelektrophorese von Plasmid-DNA.....	112
5.1.	Herstellung der Gele.....	112
5.2.	Elektrophorese.....	113
5.3.	Detektion.....	114
6.	Fluoreszenzmessungen.....	114
6.1.	Fluoreszenzspektren.....	114
6.2.	Abhängigkeit der Fluoreszenz von der Basen- zusammensetzung der DNA.....	115
7.	Belichtungsversuche.....	115
8.	Bestimmung der Dampfdruckerniedrigung.....	116
	Tabelle der untersuchten Substanzen.....	117
	Literaturverzeichnis.....	126
	Lebenslauf	

ZUSAMMENFASSUNG

Es wurde das Bindungsverhalten von biskationischen Molekülen an Desoxyribonukleinsäure (DNA) von *Bacillus subtilis* (55,5% Adenin-Thymin Basenpaare = AT) und *Micrococcus luteus* (27,5 % AT) mittels Gleichgewichtsdialyse und Differentialverteilung untersucht, wobei beide Methoden vergleichbare Ergebnisse lieferten. Der Vorteil der neuen Differentialverteilungsmethode gegenüber der literaturbekannten Gleichgewichtsdialysiermethode besteht darin, daß keine Membranen verwendet werden müssen, und damit Adsorptionseffekte wegfallen, wodurch Affinitätswerte bestimmt werden können, die der Dialysiermethode nicht mehr zugänglich sind.

Besonders hohe Affinitäten für *Bacillus subtilis*-DNA (DNA_{BS}) zeigen folgende Diimidazolinylderivate:

1. 2-[2-(2-Imidazolin-2-yl)-1-benzofuran-5-yl]-6-[6-(2-imidazolin-2-yl)-2-indolyl]indol (Nr. 52): $\phi = 1,5 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1}$
2. 2-[4-(2-Imidazolin-2-yl)phenyl]-6-[6-(2-imidazolin-2-yl)-2-indolyl]indol (Nr. 50): $\phi = 2,3 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1}$
3. 2-[2-(2-Imidazolin-2-yl)-6-indolyl]-6-[6-(2-imidazolin-2-yl)-2-indolyl]indol (Nr. 51) : $\phi = 3,4 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1}$

Die Spezifität der Indolderivate für AT-Paare nimmt mit steigender Affinität ab, wobei sich bei den Affinitäten ϕ für DNA_{BS} folgende Regelmäßigkeiten ergaben:

1. Die Affinität nimmt in der Reihenfolge Indol>Benzimidazol>Benzofuran ab.
2. Eine Substitution mit einer zusätzlichen Aminogruppe bringt nur geringe Veränderungen im Bindungsverhalten.
3. Analoge Imidazolin-oder Amidinverbindungen besitzen ähnliche Affinität.
4. Die Affinität nimmt mit dem Verteilungskoeffizienten und der Länge des Moleküls zu.

Im Mäuseversuch besonders antileukämisch wirksame, biskationische Verbindungen besitzen eine Affinität für AT-reiche DNA, eine gewisse Molekülgröße mit entsprechender Lipophilie und eine hohe Blutspiegel verhindernde Schwerlöslichkeit.

Gegen *Trypanosoma congolense* im Mäuseversuch gut wirksame biskationische Diamidinverbindungen binden spezifisch an AT-reiche DNA.

Mittels gelelektrophoretischer Untersuchungen an kovalent-geschlossener, ringförmiger DNA superhelikaler Struktur (ccc-DNA) konnte sichergestellt werden, daß die untersuchten biskationischen Verbindungen, unabhängig von ihrer Affinität zu DNA, nicht interkalieren.

Die in Belichtungsversuchen geprüften fluoreszierenden biskationischen Verbindungen wurden durch Bindung an DNA stabilisiert, wobei die Fluoreszenzausbeute bei den zur Chromosomenfärbung geeigneten Verbindungen stark erhöht wurde.

A. Theoretischer Teil

1. Ausgangspunkt und Zielsetzung der Untersuchungen

1.1. Hemmstoffe der Nukleinsäuresynthese

Zur Chemotherapie von Infektionskrankheiten und Tumoren werden eine Vielzahl chemisch sehr unterschiedlicher, sowohl natürlich vorkommender, als auch synthetisch hergestellter Verbindungen verwendet, die sich hinsichtlich ihres Wirkungsmechanismus unterscheiden ¹⁾. Neben Substanzen, welche die Synthese der Zellwand von Mikroorganismen blockieren, oder die Permeabilität der Cytoplasmamembran stören, oder die Funktion der Ribosomen beeinträchtigen, ragen besonders Substanzen heraus, welche die Nukleinsäuresynthese hemmen ²⁾.

1.1.1. Antimetabolite

Unter Antimetabolite versteht man Verbindungen, welche die Nukleinsäuresynthese auf der Stufe der Nukleotide stören, indem sie wie Azaserin und Methotrexat ^{R 2)} die Neusynthese von Purinen und Pyrimidinen verhindern, wie 6-Mercaptopurin und 5-Fluorouracil ^{2,3)} die Umwandlung der Nukleotide ineinander blockieren, oder wie 5-Bromdesoxyuridin und 3'-Desoxyadenosin ²⁾ anstelle der richtigen Nukleotide in die DNA eingebaut werden.

1.1.2. Enzymhemmstoffe

Neben einer Störung des Nukleotidstoffwechsels können chemotherapeutisch aktive Verbindungen auch die Verknüpfung der Nukleotide zu einer funktionstüchtigen DNA bzw. RNA verhindern, indem sie mit den entsprechenden Enzymen, die diese Verknüpfung bewerkstelligen, interagieren. Als vorwiegend antibakteriell eingesetzte Verbindung verhindert z. B. Rifampicin die Synthese von RNA, während Nalidixinsäure und Novobiocin die DNA-Synthese beeinträchtigen ²⁾.

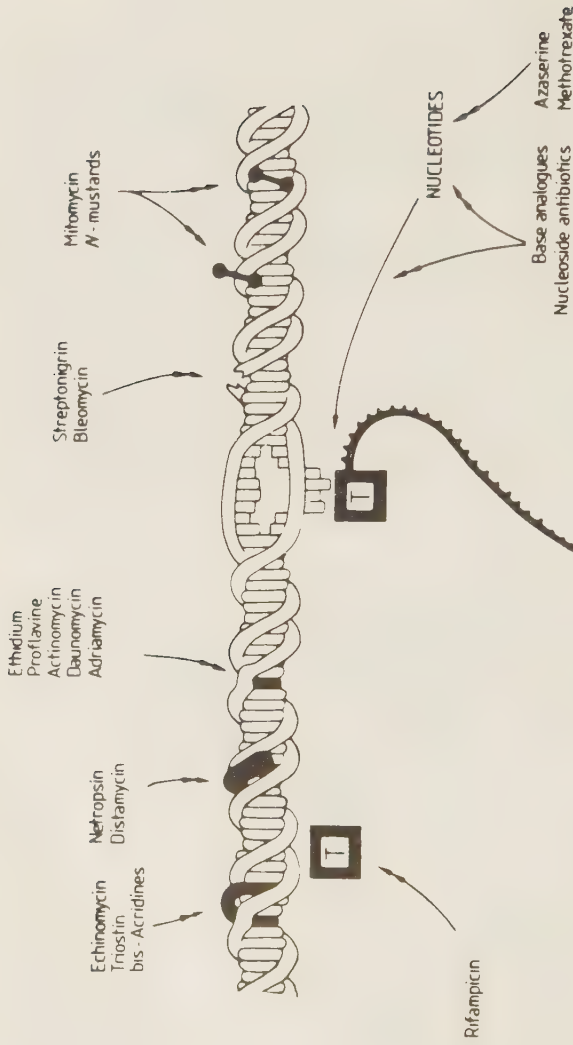


Abbildung 1: Angriffspunkte von Hemistoffen der Nukleinsäuresynthese
 T = Transkriptionsenzym (RNA-Polymerase)
 nach M. J. Waring⁴⁾

1.1.3. Matrizenfunktionshemmstoffe

Zu den Matrizenfunktionshemmstoffen, die in der Lage sind, sowohl direkt, als auch indirekt die Replikation bzw. Transkription der DNA zu beeinflussen, rechnet man eine Vielzahl chemotherapeutisch und antitumorwirksamer Verbindungen, weshalb auf deren Wirkungsmechanismus und Anwendbarkeit im folgenden näher eingegangen werden soll.

1.2. Bindungsart der Matrizenfunktionshemmstoffe

1.2.1. Kovalente Bindung

Die festeste Bindung zwischen DNA und einem Liganden wird durch die Ausbildung einer kovalenten Bindung zwischen beiden Partnern bewirkt. Dabei erfolgt meist ein elektrophiler Angriff des Liganden auf eine nukleophile Stelle der DNA, wobei eine Base alkyliert, die DNA-Stränge quervernetzt, oder Strangbrüche erfolgen können. Der Prototyp N-Methyl-Lost $[\text{CH}_3\text{-N-(CH}_2\text{-CH}_2\text{-Cl)}_2]$, das als Antitumormittel Verwendung findet, ist ein Beispiel für eine Verbindung, die mit der DNA irreversible Bindungen eingeht ³⁾, wobei sowohl in vivo als auch in vitro eine Monoalkylierung des N-7-Atoms von Guanin vorherrscht. Daneben tritt auch eine Zweifachalkylierung auf, die zur Verknüpfung zweier DNA-Stränge oder zur Verknüpfung eines DNA-Stranges mit einem Protein führen kann ²⁾. Neben N-Methyl-Lost können als weitere synthetische Alkylantien Cyclophosphamid, Trenimon ^R und cis-Diamminchlorplatin (II) eingesetzt werden ^{2,3)}.

Von den natürlichen Alkylantien hat Mitomycin die größte Bedeutung, wobei seine Wirksamkeit auf einer Hemmung der DNA-Synthese beruht. Als Wirkungsmechanismus wurde erkannt, daß Mitomycin in vivo zuerst zu einem Hydrochinonderivat reduziert werden muß, sich dann über ein Semichinon zu einem bisalkylierenden Indolderivat umwandelt, das zur kovalenten Verknüpfung zweier Guaninbasen führt ^{2,5)}.

Streptonigrin und Bleomycin verursachen Einzel- und Doppelstrangbrüche in der DNA ⁵⁾ über einen Radikalmechanismus, an dem Sauerstoff beteiligt ist ^{2,4)}.

Neben diesen kovalent bindenden oder Strangbrüche verursachenden Verbindungen spielen die größte Rolle Substanzen, die mit der DNA reversible Komplexe bilden, wobei zwischen einer Interkalation und einer Außenanlagerung zu unterscheiden ist.

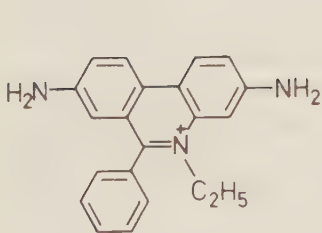
1.2.2. Interkalation

Unter Interkalation versteht man nach L. S. L e r m a n ⁶⁾ die Erscheinung, daß eine flache, polyzyklische, aromatische Verbindung in der Lage ist, sich zwischen die Basenpaare der DNA einzuschieben, wobei sie parallel zu den Basenpaaren und senkrecht zur Helixachse zum Liegen kommt. Stabilisiert wird diese Komplexform durch Wechselwirkung der π -Elektronen von Basenpaaren und dem Liganden, wobei häufig eine bevorzugte Bindung an Guanin-Cytosin Basenpaare stattfindet ⁷⁾. Dieses 1961 entwickelte Modell forderte ein örtliches Aufwinden der DNA um 45° ⁶⁾, um Raum für den Liganden zu schaffen. Nach W. F u l l e r und M. J. W a r i n g sollte der Entspiralisierungswinkel unter Berücksichtigung der Interaktion der Aminogruppen des Ethidiums mit dem Sauerstoffatom einer Phosphatgruppe 12° ⁸⁾ betragen, während neuerdings ein Wert von 26° angenommen wird ^{2,9)}.

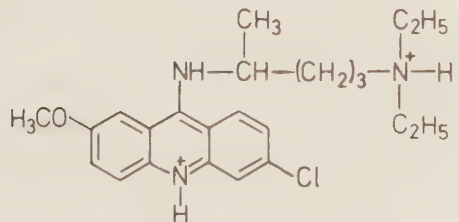
Eine Bestätigung dieses Modells läßt sich mit verschiedenen Methoden erbringen. Sowohl mit Hilfe von Fluoreszenzpolarisationsstudien ¹⁰⁾ und Elektronenspinresonanzuntersuchungen an einem Derivat von Ethidium mit N-Oxidgruppierung ¹¹⁾, als auch insbesondere durch röntgenographische Untersuchung von kristallinen Ligand-Dinukleotidkomplexen ⁴⁾ konnte die Lage der interkalierenden Liganden als parallel zu den Basenpaaren erkannt werden.



Abbildung 2: Interkalationsmodell: links normale DNA, rechts DNA mit interkaliertem Proflavin (dunkel) nach Lerman ¹⁵⁾



Ethidium



Quinacrin

Durch Viskositätsmessungen ermittelt man eine entsprechende Längenänderung der DNA ¹²⁾, während durch das Aufdrehen kovalent-geschlossener, ringförmiger DNA superhelikaler Struktur (ccc-DNA) der Entspiralisierungswinkel festgelegt werden kann ¹³⁾ (siehe Abb. 4, S. 30).

Als Modellverbindung zur Untersuchung dieses Phänomens diente Ethidium, das sich biologisch durch eine gute Wirksamkeit gegen Trypanosomen auszeichnet ¹⁴⁾.

Außer diesem Phenanthridinderivat können auch Derivate des ebenfalls flachen, isomeren Acridinringsystems zwischen die Basenpaare eingelagert werden. Unter den Acridinen finden sich Verbindungen mit antibakteriellen, gegen andere Protozoen gerichteten Eigenschaften ²⁾, und neuerdings in Form der Diacridinderivate auch antitumorwirksame Verbindungen. Bei diesen Diacridinen wurde das Ziel verfolgt, eine Erhöhung der Wirksamkeit durch eine Erhöhung der DNA-Affinität zu erzielen, was durch Verknüpfung zweier Acridinringe über eine Kohlenwasserstoffbrücke bewerkstelligt wurde, und zu bisinterkalierenden Verbindungen führte ¹⁶⁾.

Actinomycin ^{2,17)}, die Anthracycline Daunomycin ¹⁸⁾ und Adriamycin ¹⁹⁾, Ellipticin ⁴⁾, und die interkalierenden Chinoxalinabkömmlinge Triostin ²⁰⁾ und Echinomycin ^{2,21)} zeichnen sich ebenfalls durch gute Wirksamkeit gegen Tumoren aus und stellen starke Hemmstoffe der DNA-abhängigen RNA-Synthese dar, die im Zusammenhang mit einer Bindung an DNA gesehen werden muß ²⁾.

2.2.3. Außenanlagerung

Neben der interkalierenden existiert eine weitere Gruppe von Verbindungen, die sich durch eine Außenanlagerung an die DNA auszeichnet. Hierbei kann der Ligand, soweit bekannt, in die große oder kleine Helixrille eingelagert werden, und die Orientierung der Längsachse des Liganden stimmt meist mit der Rich-

tung der Helixachse oder mit der Steigung der Helix überein. Da bei dieser Bindungsart der Ligand von den Basen gebundenes Wasser verdrängen muß, beobachtet man auf Grund der schwächeren Bindung von Wassermolekülen an Adenin-Thymin Basenpaare häufig eine AT-Spezifität des Liganden ²²⁾. Bei dieser Art der Interaktion mit DNA stellen sich wie bei der Interkalation verschiedene biologische Effekte ein, die im Zusammenhang mit der Bindung an DNA stehen.

Zu den natürlichen Vertretern dieser Gruppe zählen mit Spermin und Spermidin Verbindungen, die sich strukturell durch zwei voneinander getrennte kationische Zentren auszeichnen und in eine Vielzahl von Regulationsmechanismen in der Zelle eingreifen ²³⁾, die zur Zeit Gegenstand intensiver Forschung sind.

Netropsin und Distamycin sind basische Oligopeptidantibiotika, die aus zwei bzw. drei N-Methylpyrrol-Ringen bestehen und das Wachstum von Viren beeinträchtigen, was auf einer Hemmung von DNA- und RNA-Polymerasen beruhen dürfte ²⁾. Die Verbindungen zeichnen sich durch eine starke Bindung an DNA aus mit einer Bevorzugung von Adenin-Thymin Basenpaaren ^{24,25)}.

Eine Außenanlagerung kann auf Grund von Ergebnissen von G. Luck ²⁶⁾ und R.M. Wartell ²⁵⁾ mit kovalentgeschlossener, ringförmiger DNA superhelikaler Struktur (ccc-DNA) und durch Röntgenstrukturanalyse von Kristallen ²⁷⁾ angenommen werden. Synthetisch hergestellte, nicht interkalierende Verbindungen erregen großes Interesse durch ihre trypanoziden und antileukämischen Wirksamkeiten, die mit einer diagnostischen Anwendbarkeit als Fluoreszenzfarbstoffe einhergehen können.

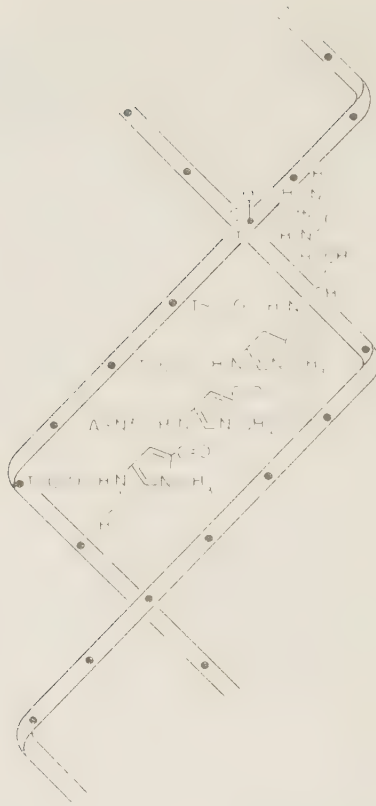


Abbildung 3: Schematische Darstellung der Bindung von Distamycin an Adenin-Thymin Basenpaare der DNA. Distamycin liegt in der kleinen Rille der DNA und bildet über die Stickstoffatome der Amidgruppen Wasserstoffbrückenbindungen zur Carbonylgruppe des Thymins bzw. zum N-3 des Adenins aus ²⁴⁾.

1.3. Anwendungsgebiete nicht interkalierender, synthetischer Verbindungen

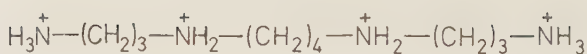
1.3.1. Therapie der Leukämie

Von A. Marxer²⁸⁾ wurde 1967 eine große Zahl von Diarylbisguanylhydrazonen dargestellt, von denen sich 4,4'-Diacetyldiphenylharnstoffbisguanylhydrazon (DDUG) als am besten wirksam gegen die Leukämie L 1210 erwies.

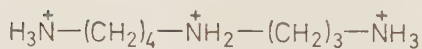
C. Dave, M. J. Ehrke und E. Mihich²⁹⁾ untersuchten 1977 die Bindung verschiedener Bisguanylhydrazone an DNA und kamen zu dem Ergebnis, daß die Hemmung einer DNA-abhängigen DNA-Polymerase einen möglichen Wirkungsmechanismus darstellt. Gestützt wurde dieser Befund durch W. A. Denney und B. F. Cain³⁰⁾, die 1979 diese Polymeraseergebnisse mit der in vivo Wirksamkeit gegen die Leukämie L 1210 und der Bindung an Polynukleotide in Beziehung setzten; sie konnten eine direkte Relation zwischen der Bindung an poly[d(AT)] bzw. poly[d(GC)] und der Polymeraseaktivität feststellen, und auch unter Einbeziehung der Lipophilie der Moleküle einen Zusammenhang mit der Wirksamkeit in vivo herstellen.

Im Gegensatz dazu stehen aliphatische Bisguanylhydrazone, deren wichtigster Vertreter das Methylglyoxalbisguanylhydrazon (MeGAG) ist. Dieses bindet nur schwach an DNA und zeigt damit nur eine geringe Beeinflussung der DNA-Polymeraseaktivität²⁹⁾, hemmt jedoch das Enzym S-Adenosylmethionindecaboxylase³¹⁾, das an der Synthese von Polyaminen wie z. B. Spermidin beteiligt ist, in erheblichem Ausmaß, weshalb dieser Effekt als Wirkungsmechanismus angesehen worden ist; jedoch zeigen homologe Verbindungen des MeGAG, welche anstelle der Methylgruppe eine Ethyl- oder n-Propyl-Gruppe besitzen keine antileukämische Wirksamkeit trotz deutlicher Enzymhemmung³²⁾.

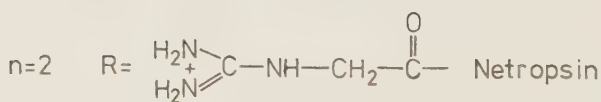
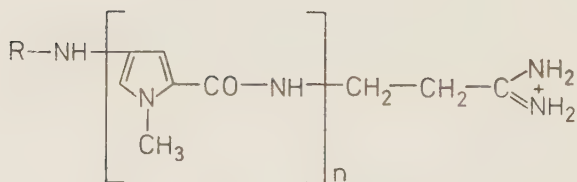
Formelübersicht I



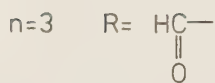
Spermin



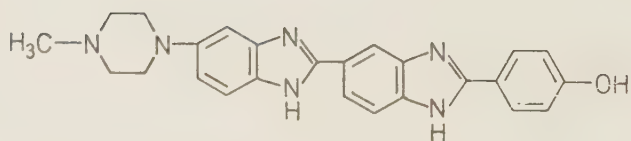
Spermidin



Netropsin



Distamycin A



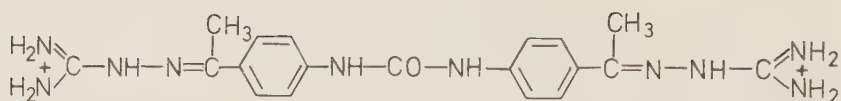
Hoechst 33258

In den 60er Jahren wurden von B. F. C a i n ³³⁾ und Mitarbeitern Verbindungen synthetisiert, die sich in Anlehnung an Phthalanilide aus mehreren aromatischen Ringen und zwei endständigen, quartären, stickstoffhaltigen Heterozyklen zusammensetzen. Hierbei erreichte z. B. NSC 101327 bei einer Dosierung von 10 mg/kg/Tag bei einer 5 Tage dauernden Behandlung gegen die Mäuseleukämie L 1210 einen T/C-Wert von 265 ³⁴⁾ (siehe S. 79). Dabei war die DNA-Bindung und ein optimales Verhältnis zwischen Lipophilie und Hydrophilie ausschlaggebend für eine Wirkung ³⁵⁾.

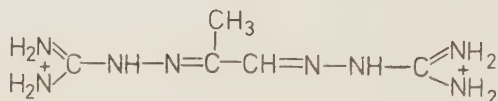
Der obige Ausdruck Phthalanilide bezieht sich auf eine Vielzahl ähnlicher, antileukämisch aktiver Verbindungen, deren gemeinsames Merkmal ein Molekül Phthalsäure ist, das beidseitig über Amidgruppierungen mit basisch substituierten Anilinen verknüpft ist, und die von R. H i r t und R. B e r c h t o l d ³⁶⁾ zuerst synthetisiert wurden. Besonders wirksam erwiesen sich u. a. Verbindungen, wie NSC 35843, die sich durch zwei endständige Imidazolinreste und der Möglichkeit zur Ausbildung von Nebervalenzbindungen im mittleren Teil des Moleküls auszeichneten. Jedoch konnten sich diese Verbindungen auf Grund ihrer Toxizität, die sich vor allem in Thrombophlebitis und der Schädigung von Niere und Leber äußerten, in der Therapie nicht durchsetzen ³⁷⁾.

Dieses biskationische Strukturprinzip findet sich auch bei chemotherapeutisch gegen Trypanosomeninfektionen anwendbaren Diamidinen (wie z. B. Stilbamidin ³⁸⁾ und 2-Hydroxystilbamidin ³⁹⁾), welche ebenfalls antileukämische Wirksamkeit zeigen.

FORMELÜBERSICHT II



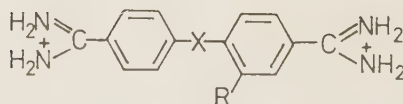
4,4'-Diacetyldiphenylharnstoff-bis-guanylharnstoff (DDUG)



Methylglyoxal-bis-guanylharnstoff (MeGaG)



R	
	NSC 101327
	NSC 35843



R	X	
-H	-O-(CH ₂) ₅ -O-	Pentamidin
-OH	-CH=CH-	Hydroxystilbamidin
-H	-N=N-NH-	Diminazen (Berenil ^R)

1.3.2. Therapie der Trypanosomiasis

Gegen die menschenpathogenen Trypanosomen *T. brucei gambiense* und *T. brucei rhodesiense* sind von den Diamidinen vor allem Pentamidin⁴⁰⁾, Hydroxystilbamidin⁴³⁾ und im Mäusetest 2-(4-Amidinophenyl)-1-benzofuran-5-carboxamidin⁴¹⁾ (150/49) besonders wirksam. Gemeinsam ist diesen Verbindungen, daß sie an DNA binden⁴²⁾, und als kationische Substanzen schnell in den Kinetoplasten eindringen können. Dort wird eine Veränderung der Kinetoplasten-DNA (k-DNA) hervorgerufen, die sich im Elektronenmikroskop darin zeigt, daß sich die ursprünglich fibrillären, lamellaren Strukturen auflösen und dichtgepackte DNA-Massen auftreten, was bis zu einem Verschwinden des Kinetoplasten, der Dyskinetoplastie, führen kann⁴³⁾.

Weiterhin konnte gezeigt werden, daß gut gegen *T. brucei rhodesiense* wirksame Verbindungen auch stets gute Hemmstoffe von Serinproteinasen sind⁴⁴⁾, womit auch eine schlechtere Wirksamkeit von Diimidazolin- im Gegensatz zu Diamidinverbindungen erklärt werden kann, da erstere eine schwächere Enzymhemmung aufweisen⁴⁵⁾, während die DNA-Bindungsparameter nahezu unverändert bleiben⁴²⁾. Dies legt als Wirkungsmechanismus sowohl eine Bindung an die k-DNA der Trypanosomen, als auch eine Hemmung von Proteinasen nahe, zumal bei humanpathogenen Trypanosomen als Gewebeparasiten beim Durchwandern der Blutgefäße eine Proteinolyse stattfinden muß.

Die rinderpathogenen Trypanosomen *T. congolense* sind vor allem für die Rinderzucht Zentralafrikas von Bedeutung, da wegen der Infektionsgefahr ca. 1/3 der Weidefläche nicht genutzt werden kann⁴⁶⁾. Eine Wirkung gegen diese Plasmoparasiten entfaltet das von H. J e n s c h⁴⁷⁾ entwickelte Berenil^R und das von O. D a n n und Mitarbeitern synthetisierte 102/198 (Nr. 3). Beide Verbindungen zeichnen sich durch eine starke Bindung an DNA aus, die gepaart ist mit einer Spezifität für Adenin-Thymin Basenpaare⁴²⁾, weshalb

als Hauptangriffspunkt dieser Verbindungen die k-DNA der Trypanosomen, die sich durch einen hohen Adenin-Thymin Gehalt auszeichnet ⁴³⁾, in Betracht kommt.

1.3.3. Diagnostische Anwendungsmöglichkeiten

Mit der Anlagerung fluoreszierender Verbindungen an DNA geht eine erkennbare Verschiebung des Emissionsmaximums ins Längere und eine Erhöhung bzw. Erniedrigung der Fluoreszenzintensität einher ^{48,49)}. Diese Veränderungen sind einerseits von der Struktur der Verbindung und ihrer Bindungsstärke und Bindungselektivität an DNA und andererseits von der Basenzusammensetzung der DNA abhängig ⁴⁹⁾.

Neben den interkalierenden Verbindungen Quinacrin ⁴⁹⁾ und Quinacrin-mustard finden auch nicht interkalierende Verbindungen wie Hoechst 33258 ⁴⁸⁾ und das Antibiotikum Mithramycin ⁵⁰⁾ Verwendung zur Anfärbung von DNA in der Cytofluorimetrie ⁵⁰⁾ oder zur Chromosomenfärbung in der Genetik ⁴⁸⁾.

Durch D. H. W i l l i a m s o n ⁵¹⁾ wurde 1975 das von O. D a n n und Mitarbeitern synthetisierte DAPI (Nr. 3) als geeignet für eine Anfärbung von DNA in den Kernen und Mitochondrien von Hefezellen gefunden. Desweiteren kann eine Mykoplasmeninfektion in Zellkulturen und, ebenfalls durch Fluoreszenzfärbung, eine Darstellung für die medizinische Diagnostik wichtiger Bakterien, Pilze und Phagozyten erreicht werden ⁵²⁾.

Neben einer Anwendung in der Cytofluorimetrie ⁵⁰⁾ und zur Anfärbung von Trypanosomen ⁵³⁾ zeichnet sich die Verbindung durch eine intensive Bänderung von Chromosomen aus, was von D. S c h w e i z e r ⁵⁴⁾ in Kombination mit anderen Fluorochromen in Form von Doppel- und Dreifachfärbungen in der Chromosomenforschung und von W. S c h n e d l ⁵⁵⁾ für Fluoreszenzfärbungen in der Humangenetik genutzt wird.

Hierbei zeigt DAPI ein dem Hoechst 33258 ähnliches Muster und zeichnet sich durch scharfe Bänderung, starke Fluoreszenz und UV-Stabilität aus, was zur weiteren Untersuchung ähnlicher Verbindungen herausforderte ⁵⁵⁾.

1.4. Zielsetzung der eigenen Untersuchungen

Das Ziel meiner Untersuchungen bestand darin, für sehr stark an DNA bindende und relativ schwerlösliche Verbindungen eine neue Methode zur Messung ihrer Affinität und Spezifität für DNA zu entwickeln, da die bisher verwendeten literaturbeschriebenen Methoden nicht zum Erfolg führten. Dabei sollten die erhaltenen Werte mit den Ergebnissen, die mittels der von W. Müller beschriebenen ⁵⁶⁾ und von G. Minet ⁴²⁾ erfolgreich eingesetzten Dreizellenapparatur durch Gleichgewichtsdialyse erhalten wurden, vergleichbar sein.

Mit diesen Untersuchungen sollte eine etwaige Korrelation zwischen dem Bindungsverhalten an DNA und der chemotherapeutischen Wirksamkeit gesucht werden.

Mit Hilfe literaturbekannter Untersuchungsmethoden sollte die Bindungsart von Diamidinen und Diimidazolininen abgesichert werden, da in der Literatur sowohl über eine Außenanlagerung an DNA ^{57,58)}, als auch über eine Interkalation ^{59,60)} berichtet worden ist.

Das Fluoreszenzverhalten und die Photostabilität der an DNA mit verschiedener Basenzusammensetzung gebundenen Verbindungen sollte mit der Eigenschaft als Fluoreszenzfarbstoff für Chromosomen verglichen werden.

2. Untersuchung von DNA-Ligand Interaktionen

2.1. Bestimmung von Affinität und Spezifität

2.1.1. Literaturbekannte Methoden

2.1.1.1. UV-Titration

Bindungsstudien lassen sich mit Hilfe von UV-Messungen durchführen, da bei einer Bindung eines Liganden an DNA häufig sein Absorptionsmaximum ins Längerwellige verschoben und sein molarer Extinktionskoeffizient erniedrigt wird, was sich quantitativ auswerten läßt. Dabei müssen folgende Bedingungen erfüllt sein:

1. die DNA darf im Meßbereich nicht absorbieren
2. freier und gebundener Ligand müssen dem Beer'schen Gesetz folgen
3. der Extinktionskoeffizient darf sich nicht mit der Beladung ändern
4. es muß ein isosbestischer Punkt vorhanden sein.

Angewandt wurde die Methode zur quantitativen Bestimmung von Bindungsparametern bei einer Vielzahl von Verbindungen, von denen ich beispielhaft folgende erwähnen möchte:

W. Müller¹⁷⁾ untersuchte die Bindung von Actinomycin an DNA, während M. J. Waring⁶¹⁾ sich mit Ethidium und Prothidium, und S. Sengupta⁶²⁾ mit 7-substituierten Actinomycinen beschäftigte. C. Dave²⁹⁾ studierte das Verhalten von Bisguanylhydrazonen bei Anwesenheit von DNA, während Netropsin von R. M. Wartell²⁵⁾ untersucht wurde. Von K. Morikawa⁶³⁾ wurde das Bindungsverhalten von DAPI (Nr. 3) an Polynukleotide mittels Fluoreszenz und UV-Absorption studiert. Dabei traten zwei isosbestische Punkte bei 297 nm und 367 nm auf; es wurden zwei Arten von Bindungen postuliert, wobei die durch UV-Ab-

sorption im höheren Konzentrationsbereich meßbare keine Basenspezifität aufweist.

2.1.1.2. Fluoreszenztitrationen

Quantitative Aussagen über das Bindungsverhalten an DNA oder Polynukleotide lassen sich machen, wenn die zu untersuchenden Verbindungen fluoreszieren und bei dem Bindungsvorgang eine deutliche Änderung ihres Fluoreszenzverhaltens zeigen. Eine ausgeprägte Fluoreszenzlöschung tritt bei Anthracyclinderivaten auf, was vor allem von F. Z u n i n o ⁶⁴⁾ und V. H. D u V e r n a y ⁶⁵⁾ zur Bestimmung von Bindungsparametern genutzt wurde. Dagegen zeigt Ethidium eine deutliche Steigerung seiner Fluoreszenz bei der Interaktion mit DNA, was einerseits zur Ermittlung seiner Bindungseigenschaften ¹⁰⁾, andererseits, indem es von anderen Liganden verdrängt wird, zur Bestimmung dieser Ligandenbindung angewandt wurde, wobei sich bei dieser Verdrängungsmethode nur relative Aussagen machen lassen ³⁵⁾.

Nachdem das nicht fluoreszierende Netropsin in ein fluoreszierendes Dansylderivat überführt worden war, konnte dessen Bindung an DNA bestimmt werden ²⁴⁾, während Hydroxystilbamidin und DAPI ⁶⁰⁾ selbst ausgeprägte Fluoreszenzerhöhungen zeigen. Bei DAPI fand K. M o r i k a w a ⁶³⁾ in dem durch Fluoreszenzstudien zugänglichen, niedrigen Beladungsbereich eine Spezifität für Adenin-Thymin Basenpaare bei der Bindung an Polynukleotide; J. K a p u ś c i Ń s k i ⁶⁶⁾ ermittelte für DAPI eine Bindungskonstante nach J. M c G h e e und P. v o n H i p p e l ⁶⁷⁾ von $3,2 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}$ bei einem Bedarf von 6 Nukleotiden pro gebundenem Molekül DAPI, was drei Basenpaaren entspricht.

2.1.1.3. Ultrazentrifugationsmethoden

Setzt man eine Lösung, bestehend aus DNA und einem Liganden, einem hohen Zentrifugalfeld aus, so sedimentiert die DNA mit dem gebundenen Liganden, während der freie Anteil unbeeinflusst bleibt. Der Sedimentationsprozess kann in einer analytischen Ultrazentrifuge verfolgt werden, indem die gebundene und die freie Ligandenkonzentration durch Absorptionsmessung am isosbestischen Punkt bestimmt wird.

Entwickelt wurde die Methode von I. Z. S t e i n b e r g und H. K. S c h a c h m a n n ⁶⁸⁾, um das Bindungsverhalten von kleinen Molekülen an Proteine zu studieren. P. H. L l o y d ⁶⁹⁾ untersuchte das System Proflavin-DNA, während von G. L u c k ²⁶⁾ quantitative Aussagen über die Interaktion von Netropsin und DNA gemacht werden konnten.

Eine Variation der Methode besteht darin, daß man in einer präparativen Ultrazentrifuge die DNA-Lösung mit bekanntem Ligandengehalt einer so starken Zentrifugalkraft unterwirft, daß es zur Sedimentation der DNA kommt, und am Ende der Zentrifugation im Überstand der freie Ligandanteil gemessen werden kann. Erfolgreich eingesetzt wurde die Methode von B. F e s t y ⁷⁰⁾ im System Hydroxystilbamidin-DNA und bei der Untersuchung des Bindungsverhaltens von interkalierenden Platin(II)-Komplexen an DNA ⁷¹⁾.

2.1.1.4. Gelfiltration

Die Methode, die 1962 von J. P. H u m m e l und W. J. D r e y e r ⁷²⁾ beschrieben wurde, beruht auf folgendem Prinzip: Bringt man die Lösung eines Liganden zusammen mit DNA auf eine Sephadex G-25 Gel-Säule, die vorher mit dem Liganden äquilibriert wurde, und eluiert mit der gleichen Ligandenkonzentration, so kann man feststellen, daß der DNA-

Ligand-Komplex im Ausschlußvolumen der Säule wandert und mehr Ligand mitreißt, wodurch die Ligandenkonzentration im Eluat zunächst ansteigt, im späteren Verlauf der Elution unter den Basiswert abfällt, und schließlich zur Äquilibriumkonzentration zurückkehrt. Aus der Fläche des Elutionsprofils läßt sich dann die Menge an Ligand berechnen, die von der DNA gebunden wurde, wodurch eine quantitative Auswertung ermöglicht wird.

Mit Erfolg angewandt wurde diese Methode von B. A. New -
t o n ⁷³⁾ für Berenil-DNA Interaktionsstudien und von W. M ü l -
l e r ⁷⁴⁾ für das Bindungsverhalten von Polyethylenglykolderi-
vaten basenspezifischer Liganden an DNA. Versuche von G. M i -
n e t mit DAPI waren nicht reproduzierbar, vermutlich weil
dieses sehr stark vom Gelbildner gebunden werden kann und da-
mit das Gleichgewicht DAPI-DNA gestört wird ⁴²⁾.

2.1.1.5. Gleichgewichtsdialyse

Bei dieser und der folgenden Methode handelt es sich um Ver-
fahren, die eine direkte Bestimmung der Bindungseigenschaf-
ten ohne spezielle theoretische Annahmen ermöglichen. Bei
der Dialyse liegen mindestens zwei Kompartimente vor, die
durch eine Membran voneinander getrennt sind, welche für
das Makromolekül nicht passierbar, hingegen für den Liganden
gut durchlässig sein muß. Durch die Bestimmung der ungebun-
denen Ligandenkonzentration in einem Kompartiment und der
gebundenen im anderen kommt man zu Bindungsdaten, die einer
quantitativen Auswertung zugänglich sind. Diese sehr gängige
Methode wurde u. a. genutzt zur Bestimmung der Bindungseigen-
schaften von Netropsin ²⁵⁾, Diacridinen ⁷⁵⁾, Ethidiumderiva-
ten ⁷⁶⁾ und Actinomycin an DNA ¹⁷⁾.

Eine besondere Erweiterung der Methode gelang W. M ü l l e r ⁵⁶⁾
durch den Einsatz seiner Dreizellenapparatur, mit welcher auf
elegante Weise nicht nur die Affinität an DNA, sondern gleich-

zeitig auch die Basenspezifität verschiedener Liganden untersucht werden konnte.

2.1.1.6 Verteilungsmethode

Hierbei bestimmt man die Verteilung eines Liganden zwischen einer wässrigen und einer mit Wasser nicht mischbaren organischen Phase, wobei einmal das Verteilungsverhalten ohne DNA und das andere Mal mit DNA untersucht wird, um daraus quantitative Schlüsse über das Bindungsverhalten ziehen zu können.

Eingeführt wurde die Methode von F. K a r u s h ⁷⁷⁾ im Zusammenhang mit Untersuchungen über die Interaktion von Methylorange und Rinderalbumin. Auf Nukleinsäuren wurde sie dann 1955 von H. G. H e i l w e i l ⁷⁸⁾ bei Acriflavin-DNA und von L. F. C a v a l i e r i ⁷⁹⁾ bei Rosanilin-DNA Studien angewandt.

Wieder aufgegriffen wurde die Methode erst 1975 durch M. J. W a r i n g ⁸⁰⁾, als er fand, daß sich die Verteilung zur Untersuchung der Interaktion der relativ schwerlöslichen Antibiotika Echinomycin und Triostin mit DNA einsetzen läßt.

P. D a v a n l o o ⁸¹⁾ bearbeitete 1976 das System Actinomycin/Nukleotide, während in neuerer Zeit Netropsin ⁸²⁾, verschiedene Carcinogene ⁸³⁾, Daunomycin ⁸⁴⁾, Echinomycin ²¹⁾ und halbsynthetische Triostinderivate ⁸⁵⁾ auf ihr Bindungsverhalten an DNA untersucht wurden.

Eine Erweiterung der Anwendbarkeit erfolgte durch T. R. K r u g h ⁸⁶⁾, der sich den Zusatz von Natriumtetraphenylborat zunutze machte, um den Verteilungskoeffizienten kationischer Verbindungen zu erhöhen, wodurch auch sehr hydrophile Verbindungen mit kleinem Verteilungskoeffizienten für diese Methode zugänglich sind.

2.1.2. Eigene Untersuchungen

2.1.2.1. Gleichgewichtsdialyse

Von den vorgenannten Verfahren stellen die Dialyse und die Verteilung direkte Meßmethoden dar, weshalb hauptsächlich diese zur Anwendung gelangen sollten. Für gut lösliche und nicht zu stark an DNA bindende Substanzen, für die eine gute Membranpassage gegeben ist, wurde die von W. Müller et al.⁵⁶⁾ beschriebene Gleichgewichtsdialysiermethode eingesetzt, welche auch von G. Minet⁴²⁾ bereits benutzt wurde.

Hierbei verwendet man eine zylindrische, dreiteilige Kammer aus Teflon, die so aufgebaut ist, daß mittels zweier Dialysiermembranen, die zwischen die einzelnen ringförmigen Kammerteile geklemmt werden, drei abgeschlossene Kompartimente entstehen, die durch ein verschließbares Bohrloch jeweils mit 5 ml Lösung gefüllt werden. Die ganze Apparatur wird durch Schraubzwingen zusammengehalten und für die Dialyse an eine Edelstahlvorrichtung angeschraubt, die mehrere Kammern tragen kann, und mittels eines Elektromotors in einem $25^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ warmen Wasserbad mit ca. 30 UpM bewegt wird, wodurch eine Durchmischung der Kammerinhalte erfolgt.

In einem obligaten Vorversuch muß die Passierbarkeit der Membranen für den Liganden untersucht werden, indem die mittlere Kammer mit der Ligandenlösung und die beiden äußeren Kammern mit Puffer gefüllt werden. Nach 24 Stunden wird die Membranpassage durch UV-spektroskopische Messung der Konzentration des Liganden in den drei Kompartimenten bestimmt, wobei die Membranpassage mehr als 80 % betragen sollte. Für den Hauptversuch verwendet man bakterielle DNA's von *Micrococcus luteus* (27,5 % AT) und von *Bacillus subtilis* (55,5 % AT), die sich durch ihre Basenzusammensetzung unterscheiden, und dadurch unterschiedliches Bindungsverhalten zeigen können. In die äußeren

Kammern wird jeweils 5 ml der DNA-Lösung gegeben, während in die mittlere Kammer die Ligandenlösung eingefüllt wird. Nach jeweils 48 Stunden wird die Konzentration an Ligand in allen drei Kammern gemessen, die Kammerinhalte ergänzt, und nach 48 Stunden wiederum so verfahren. Auf diese Weise gelangt man zu absteigenden Beladungswerten für die DNA's, die zu einer quantitativen Auswertung herangezogen werden können.

Die Konzentrationsbestimmung erfolgt im allgemeinen durch Zusatz von 10 % 25%-iger Natriumdodecylsulfatlösung zu den Lösungen, um den DNA-Ligand Komplex zu zerstören. Man kann dann die freie Konzentration gegen einen Leerwert und die gebundene Menge differentialspektroskopisch gegen den freien Anteil bestimmen. Die Konzentrationen werden hierbei über den molaren Extinktionskoeffizienten ermittelt. Sind die zu messenden freien Ligandenmengen im niedrigen Beladungsbereich für eine UV-Messung zu klein, so wird die entsprechende Konzentration fluorimetrisch ermittelt, indem eine Eichgerade für die Substanz mit Natriumdodecylsulfat-Zusatz aufgenommen wird, und aus dieser dann direkt die jeweilige Konzentration abgelesen werden kann.

2.1.2.2. Variationsversuche für die Dialysemembranen

Die von W. Müller^{56,7)} beschriebene Dialysiermethode war nicht geeignet zur Bestimmung sehr stark an DNA bindender Liganden, da diese die verwendete Dialysiermembran aus regenerierter Zellulose, Typ Visking 27/32 von der Firma Union Carbide, Chigago USA mit einer Dicke von 25 μm und einer MG-Ausschlußgrenze von 12000 nicht mehr passieren konnten, was auf Agglomeration beruhen könnte (siehe S. 59), und auch sehr stark an diese Membran gebunden wurden. Diese Effekte wurden sowohl in Phosphat- und Cacodylatpuffer, als auch bei wässrigen Ligandenlösungen beobachtet.

Auch Spectrapor^R Membranen der Firma Spectrum Med. Industries Inc. mit einer höheren Ausschlußgrenze vom Molekulargewicht 50000 und einer Dicke von 20 μm eigneten sich nicht. Ein mög-

licher Grund für die starke Adsorption wurde von mir in dem Vorhandensein von freien Carboxylgruppen in der Membran vermutet. Deshalb versuchte ich, diese potentiell vorhandenen Carboxylgruppen einerseits durch Umsetzung mit Ethylenoxid im Autoklaven, andererseits durch Reaktion mit Diazomethan zu verestern, was jedoch keinerlei Erfolg zeigte.

2.1.2.3. Vorversuche mit anderen Methoden

2.1.2.3.1. Ultrazentrifugation

Analog den beschriebenen Untersuchungen von B. F e s t y ⁷⁰⁾ bei Hydroxystilbamidin und von M. H o w e - G r a n t ⁷¹⁾ bei interkalierenden Platin(II)-Komplexen sollten Bindungsstudien durchgeführt werden, indem in einer präparativen Ultrazentrifuge die DNA vollständig abzentrifugiert, und die freie Ligandenkonzentration im Überstand gemessen wird.

Hierzu wurde *Micrococcus luteus*-DNA 5 bzw. 24 Stunden bei 40000 bzw. 60000 U/min in einer Kontron Ultrazentrifuge in Polyallomer-Röhrchen zentrifugiert, und im Anschluß daran zur Überprüfung der Sedimentation der DNA die Konzentration im Überstand bestimmt, wobei in diesem noch ca. 5 % der eingesetzten DNA-Menge gefunden wurde. Auch ein Abgießen des Überstandes, erneutes Verteilen der DNA im Puffer, und eine abermalige Zentrifugation führten nicht zu einer quantitativen Abtrennung der DNA aus dem Überstand, weshalb diese Methode ebenfalls nicht zur Durchführung von Bindungsstudien geeignet schien.

2.1.2.3.2. Verteilungsmethode

In Vorversuchen mußte zuerst ein geeignetes Oberphasenlösungsmittel gefunden werden, das mit Wasser nicht mischbar und weiterhin in der Lage war, die zu untersuchenden biskationischen

Verbindungen genügend zu lösen, d. h. einen entsprechend großen Verteilungskoeffizienten zu gewährleisten. Von den Lösungsmitteln Heptan, Cyclohexan, Chloroform, Essigsäureethylester, Methylethylketon, Pentanol-(1), Hexanol-(1) und Oktanol-(1) zeigten allein die drei letztgenannten befriedigende Ergebnisse bei unseren biskationischen Verbindungen, die auf Grund ihrer Molekülgröße eine gewisse Lipophilie erreicht hatten.

In einem Vorversuch wurde der Verteilungskoeffizient zwischen dem in Puffer gelösten Liganden und der entsprechenden Oberphase bei verschiedenen Konzentrationen bestimmt, indem jeweils 4 ml in einem Polystyrolröhrchen durch Drehen mit 30 U/min. 30 Minuten lang innig durchmischt wurden. Anschließend wurden die Röhrchen bei 2000 U/min zentrifugiert, und die gegen den entsprechenden Leerwert spektralphotometrisch gemessenen Konzentrationen zur Bestimmung des Verteilungskoeffizienten herangezogen.

Die Konzentrationsbestimmung erfolgte über den molaren Extinktionskoeffizienten der Verbindung für die Oberphase in mit Unterphase gesättigter Oberphase und für die Unterphase in mit Oberphase gesättigter Unterphase.

Im Hauptversuch wurde der Puffer als Unterphase durch DNA-Pufferlösung ersetzt und wiederum das Verteilungsverhalten des Liganden bei verschiedenen Konzentrationen bestimmt. Dividierte man nun die im Hauptversuch gefundenen Konzentrationen der Oberphase durch den Verteilungskoeffizienten, dann erhielt man die in der Unterphase vorliegende freie Konzentration an Ligand. Nach Zerstörung des DNA-Komplexes in der Unterphase mit Natriumdodecylsulfat wird spektralphotometrisch die Summe von freien und gebundenem Liganden ermittelt.

Diese Versuche lieferten brauchbare Ergebnisse, die dazu herausforderten, eine auf der Verteilung beruhende Methode zu entwickeln, die es auf einfache Weise gestattet, ähnlich wie

bei der Dreizellenapparatur, direkte Aussagen über die Spezifität und Affinität verschiedener Liganden zu zwei DNA-Arten unterschiedlicher Basenzusammensetzung zu machen.

2.1.2.4. Differentialverteilungsmethode

Diese Methode verwendet als Kammer (Abb. 28, S. 98) zwei miteinander verbundene Reagensgläser, von denen jedes mit gleichkonzentrierten Lösungen von DNA mit verschiedener Basenzusammensetzung gefüllt wird. Beide überschichtet man mit der gemeinsamen Oberphase, in der der Ligand gelöst ist, wobei die Oberphase durch eine Bohrung im Reagensglas eine Verbindung zwischen beiden Kompartimenten herstellt. Diese Anordnung wird nach Einbringen zweier Rührspatel mit zwei Stopfen verschlossen, mit Aluminiumfolie umhüllt, und in einem 25 °C warmen Wasserbad, das auf Magnetrührern steht, senkrecht mit Klammern befestigt. Die Magnet-rührer dienen dazu, eine Bewegung in den Kammern herbeizuführen, da sich in jeder ein Rührspatel befindet an dem ein kleiner Magnet angebracht ist, was zu einer Drehung der Rührspatel mit ca. 80 U/min. führt, ohne daß eine Durchmischung von Oberphase und Unterphase erfolgt.

Nach 24-stündiger Gleichgewichtseinstellung kann man in den einzelnen Kammern mit verschiedener Gesamtkonzentration die Oberphase UV-spektrometrisch oder bei niedrigen Konzentrationen fluorimetrisch und die Unterphase nach Natriumdodecylsulfatzusatz ebenfalls spektralphotometrisch bestimmen.

Über den bei verschiedenen Ligandenkonzentrationen in der Oberphase analog mit Pufferlösung bestimmten Verteilungskoeffizienten läßt sich die freie Konzentration berechnen, und damit Aussagen über das Bindungsverhalten der Liganden an DNA's verschiedener Basenzusammensetzung machen, die direkt miteinander im Gleichgewicht stehen.

2.2. Unterscheidung zwischen Außenanlagerung und Interkalation

2.2.1. Gebräuchliche Methoden

Interkalierende Liganden, die sich zwischen die Basenpaare der DNA einschieben, bewirken eine Längenänderung des DNA-Stranges, die einerseits direkt mit Hilfe der Autoradiographie⁸⁷⁾ oder der Elektronenmikroskopie⁸⁸⁾ untersucht wurde, andererseits mit einer Änderung des hydrodynamischen Verhaltens einhergeht, was sich an kurzer stäbchenförmiger DNA bestimmen ließ. Diese kann in Lösung als steifer Faden¹²⁾ aufgefaßt werden, und die Viskositätsänderung der Lösung ist nur von der Längenänderung der DNA abhängig, die etwa $3,4 \text{ \AA}$ ⁶⁾ pro eingelagertem Ligand betragen soll. Neben der Viskositätsbestimmung¹²⁾ kann auch die Sedimentationsgeschwindigkeit²²⁾ stäbchenförmiger DNA untersucht werden, die ebenfalls durch das veränderte Achsenverhältnis der DNA beeinflußt wird.

Die Lage des Liganden parallel zu den Basenpaaren kann durch Fluoreszenzpolarisationsstudien¹⁰⁾ an DNA-Ligand Komplexen direkt untersucht werden, oder man verwendet als Modellverbindungen Di- oder Oligonukleotide, wo sich ebenfalls mit Hilfe von Kernresonanzuntersuchungen⁸⁹⁾ oder durch Herstellung und Vermessung kristalliner Komplexe⁴⁾ Aufschluß über das Bindungsverhalten gewinnen lassen kann.

Die eleganteste und meistbenutzte Methode zur Unterscheidung von Interkalation und Außenanlagerung beruht auf der geforderten Aufwindung der DNA bei Interkalation, die sich an kovalent-geschlossener, ringförmiger DNA superhelikaler Struktur (ccc-DNA) am besten verfolgen läßt.

2.2.2. Eigenschaften kovalent-geschlossener, ringförmiger DNA (ccc-DNA)

Nachdem J. V i n o g r a d et al.⁹⁰⁾ als erste eine kovalent-geschlossene, ringförmige DNA in der Natur bei dem Polyoma Virus aufgefunden hatten, stellte man durch weitere Unter-

suchungen fest, daß diese DNA unter anderem auch in Bakteriophagen, Plasmiden und in den Mitochondrien höherer Organismen vorkommt ²⁾. Obwohl diese DNA-Arten keine einheitliche Größe aufweisen, zeigen sie doch eine Gemeinsamkeit, nämlich daß sie aus zwei Strängen bestehen, die zu einem Ring kovalent geschlossen sind und in vitro in Form von einer Superhelix vorliegen, d. h. der eigentliche DNA-Strang ist nochmal um sich selbst gewunden ⁹¹⁾ (siehe Abb. 4). Daraus resultiert eine ungewöhnlich kompakte Struktur, die sich in einem sehr hohen Sedimentationskoeffizienten und einer niedrigen Viskosität entsprechend konzentrierter Lösungen zeigt. Als Vinograd ⁹²⁾ eine solche DNA mit einem interkalierenden Liganden belud, bewirkte der mit dem Interkalationsprozess einhergehende Aufwindungsprozess der Helix auf Grund der kovalenten Geschlossenheit der DNA einen Verlust der superhelikalen Struktur, wobei bei einer bestimmten Beladung eine sog. entspannte Form auftrat; steigerte er die Beladung mit Ligand weiter, so bildete sich wiederum eine superhelikale Struktur aus, die jetzt jedoch einen umgekehrten Drehsinn im Vergleich zur natürlichen hatte. Da die entspannte Form ihre natürliche Kompaktheit verloren hatte, fand man bei sukzessiver Beladung mit einem interkalierenden Liganden Extremwerte bei dem Sedimentationskoeffizienten, der Viskosität und bei der elektrophoretischen Beweglichkeit der DNA ²²⁾.

Die Änderung des Sedimentationskoeffizienten wurde vor allem von M. J. W a r i n g ¹⁸⁾ für eine Vielzahl von Verbindungen in der analytischen Ultrazentrifuge bestimmt, um Aussagen über ihr Bindungsverhalten machen zu können. Viskosimetrische Untersuchungen wurden z. B. an Acridinen ⁹³⁾ und Echinomycin ²¹⁾ mit Erfolg durchgeführt. Der Nachteil der viskosimetrischen Untersuchungen besteht in einem relativ hohen DNA Bedarf, während die Bestimmung des Sedimentationskoeffizienten einen hohen instrumentellen Aufwand und großen Zeitbedarf erfordert, weshalb frühzeitig auf ein eleganteres Verfahren gesonnen wurde.

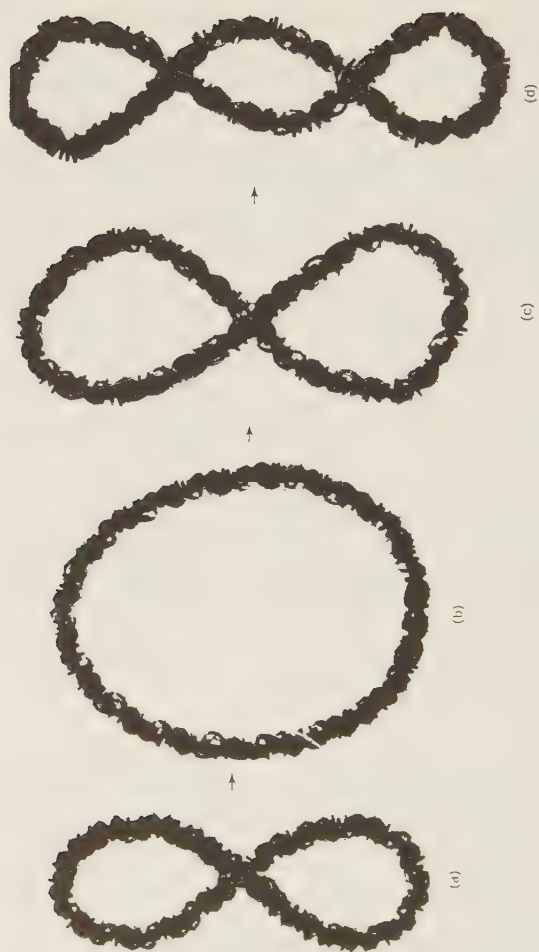


Abbildung 4: Veränderungen der Struktur von superhelikaler, kovalent-geschlossener, ringförmiger DNA bei zunehmender Beladung (a $\rightarrow$ d) mit einem interkalierenden Liganden nach Waring ⁹¹).

2.2.3. Gelelektrophorese von kovalent-geschlossener, ringförmiger DNA (ccc-DNA)

1976 berichteten R. T. Espejo⁹⁴⁾ und R. J. De Leys⁹⁵⁾ über eine gelelektrophoretische Bestimmung der Superhelikalität von kovalent-geschlossener, ringförmiger DNA mittels Ethidium. Diese Methode wurde von J. S. Lee⁹⁶⁾ zur Bestimmung des Entspiralisierungswinkels verschiedener interkalierender Liganden und in neuerer Zeit zur Unterscheidung zwischen Interkalation und Außenanlagerung genutzt⁹⁷⁾. Da sich diese Methode durch ihren geringen DNA- und Zeitbedarf auszeichnet, sollte damit von mir untersucht werden, ob Diamidine und Diimidazoline interkalieren.

Hierzu werden mehrere Glasrohre benutzt, die mit geschmolzener Agarose, in der eine bestimmte Menge des zu untersuchenden Liganden gelöst ist, gefüllt werden. Nach dem Erkalten der Agarose wird die DNA auf die geglättete Endfläche des Gelzylinders gegeben und in einer entsprechenden Apparatur eine Elektrophorese durchgeführt. Die Gele werden anschließend mit Ethidium gefärbt und unter einer UV-Lampe betrachtet, wobei sich bei einem interkalierenden Liganden folgendes Bild zeigt⁹⁴⁾: Die DNA-Präparation besteht aus einem offen-zirkularen Anteil (oc-DNA), dessen Beweglichkeit sich bei den verschiedenen Konzentrationen an Ligand kaum ändert. Ist kein Ligand im Gel, so wird die offen-zirkuläre von der superhelikalen, geschlossen-zirkulären DNA getrennt, bei ansteigender Ligandenkonzentration werden auf Grund der Entspiralisierung die Laufunterschiede zwischen offen- und geschlossen-zirkulärer DNA immer kleiner, bis sie sich bei einer bestimmten Ligandenkonzentration nicht mehr unterscheiden lassen, da keine superhelikale Form mehr vorliegt. In Gelen mit höherer Ligandenkonzentration tritt dann die Superhelikalität wieder auf, was zu einer erneuten Auftrennung von offen-zirkulärer und superhelikaler DNA führt⁹⁴⁾ (Abb. 11, S. 52).

Bei Liganden, die sich nur außen an die DNA anlagern, treten diese Effekte nicht auf. Mit zunehmender Beladung kann man höchstens schwache monotone Veränderungen des Laufverhaltens wahrnehmen ²²⁾, die von einer Ladungsneutralisation durch den zugesetzten Liganden herrühren.

3. Ergebnisse

3.1. Affinität und Spezifität

3.1.1. Spektrale Veränderungen

Die Bildung eines DNA-Ligand Komplexes äußert sich in einer bathochromen Verschiebung des Absorptionsmaximums, die meist mit einer Erniedrigung des molaren Extinktionskoeffizienten einhergeht. Beide Effekte sind sowohl vom Beladungsgrad r der AT-reichen DNA_{BS} mit dem Liganden, als auch von der Basenzusammensetzung der DNA abhängig⁹⁸⁾. Sind die Interaktionen des Liganden mit der DNA schwächer, so treten diese Effekte nur in untergeordnetem Ausmaß auf, während stark bindende Substanzen eine deutliche Verschiebung dieser Werte aufweisen, wie die beiden Beispiele zeigen:

Nr	Code-Nr.	$\lambda_{\max}$	$\lambda_{\max}(r=0,16)$	$\epsilon_{\max}$	$\epsilon_{\max}(r=0,16)$
15	261/116	309,3	310,0	29 400	26 500
42	288/3	368,8	385,2	34 200	25 000

Ein einheitlicher Extinktionskoeffizient wird durch Zugabe von 10 % 25 %-iger Natriumdodecylsulfatlösung erhalten, wodurch der DNA-Ligand Komplex zerstört wird⁷⁾ und eine direkte Messung der Konzentrationen möglich ist. In den bei der Verteilung benutzten Alkoholen zeigen die Verbindungen Absorptionswerte, die denen in Pufferlösung ähnlich sind.

3.1.2. Vergleich der Dialysiermethode mit der Differentialverteilungsmethode

Um zu untersuchen, inwieweit die Ergebnisse der Dialysiermethode mit denen der Differentialverteilungsmethode übereinstimmen, wurden Verbindungen gewählt, die mit beiden Methoden bestimmbar waren, d. h. sowohl membrangängig und genügend löslich für die Dialysiermethode, als auch genügend lipophil für

die Verteilungsmethode waren. Als Oberphase wurde Oktanol-(1) oder Hexanol-(1) verwendet und der Ligand wurde in Oberphase bzw. Unterphase gelöst. Folgende Ergebnisse wurden erhalten:

Nummer	Code-Nummer	Methode	Affinitätsparameter δ 98)		Spezifitätsparameter δ 98)
			DNABS	$M^{-1} \times 10^4$ DNAML	
4	192/188	Dialyse Verteilung Hexanol:O→U	60	3,0	0,06 42)
12	186/134	Dialyse Verteilung Oktanol:U→O	>60 ~70	5,3 8,6	0,12 0,13
33	150/129	Dialyse Verteilung Oktanol:O→U	~3,9 ~3,0	~1,8 ~1,5	~0,37 ~0,40
47	288/45	Dialyse Verteilung Hexanol:U→O	121 145	57 66	0,52 0,43

O→U: Ligand in der Oberphase gelöst

U→O: Ligand in den beiden Unterphasen in gleicher Konzentration gelöst

Tabelle 1: Vergleich der Ergebnisse von Dialysier- und Differentialverteilungsmethode

3.1.2.1. Verwendung von Hexanol-(1)

Bei der Verteilung von 192/188 (Nr. 4) zwischen DNA und Hexanol, wobei der Ligand in Hexanol gelöst ist, erhält man im Vergleich zur Dialysiermethode ⁴²⁾ etwas niedrigere Affinitätswerte und etwas größere Spezifitätswerte.

288/45 (Nr. 47) liefert bei der Verteilung von der wäßrigen in die organische Phase geringfügig höhere Affinitäts- und etwas niedrigere Spezifitätswerte.

3.1.2.2. Verwendung von Oktanol-(1)

Für 186/134 (Nr. 12) stimmen die Dialysier- ⁴²⁾ und Verteilungswerte bei den Affinitäten gut überein, während eine etwas geringere Spezifität bei der Verteilung festzustellen ist.

Bei der relativ schwach bindenden Bisbenzofuranylverbindung 150/129 (Nr. 33) liefern beide Methoden ebenfalls vergleichbare Ergebnisse.

3.1.3. DNA-Affinitäten und Spezifitäten in Abhängigkeit von der chemischen Struktur (Tab. 8, S. 117 ff.)

3.1.3.1. 2-Phenylindole

Als Standardverbindung ist das DAPI (Nr. 3) anzusehen, das als biskationisches Indolderivat sowohl elektrostatische Wechselwirkungen, als auch Wasserstoffbrückenbindungen mit der DNA eingehen kann. Hieraus erklärt sich einerseits die relativ große Affinität zu DNA, als auch andererseits eine relativ spezifische Bindung an Adenin-Thymin Basenpaare.

Ein Ersatz beider Amidgruppen gegen Imidazolingruppen bringt kaum eine Veränderung der Bindungsparameter (Nr. 4), während der Wegfall der Amidgruppe in Position 4' (Nr. 1) einen deutlichen Abfall der Affinität um den Faktor 20 bewirkt, da eine

Bindungsstelle weniger vorhanden ist. Diese Befunde stimmen gut mit den Ergebnissen von G. M i n e t ⁴²⁾ überein.

Eine Substitution in der 3-Stellung des Indols liefert Derivate mit erniedrigter Affinität bei unveränderter oder etwas verminderter Spezifität. So hat z. B. Nr. 2 mit einer CH=NOH-Gruppe in 3-Stellung nur ein Viertel der Affinität von DAPI. Das gleiche gilt bei einer Substitution durch eine NH₂-Gruppe (Nr. 5 und Nr. 6), sowohl für die Diimidazolin-, als auch für die Diamidinverbindung.

Eine Nitrogruppe in 3-Stellung (Nr. 7 und Nr. 8) setzt die Affinität auf ein Achtel der unsubstituierten Verbindung herab unter gleichzeitiger Verminderung der Spezifität, wobei als Ursache sterische Einflüsse in Frage kommen könnten.

Der Ersatz der Amidin- bzw. Imidazolingruppe in 4'-Stellung durch eine Dimethylaminogruppe (Nr. 9 und Nr. 10) äußert sich ebenfalls in einer Abnahme der Affinität um den Faktor 10 bei gleichzeitiger Verminderung der Spezifität. Eine Dimethylaminogruppe stellt also in Bezug auf die Bindungsfähigkeit an DNA keinen adäquaten Ersatz für eine Amidinogruppe dar, da diese Gruppe in BPES-Puffer (pH=7) nur zu einem geringen Teil protoniert ist, und damit ein kationisches Ende in Wegfall kommt.

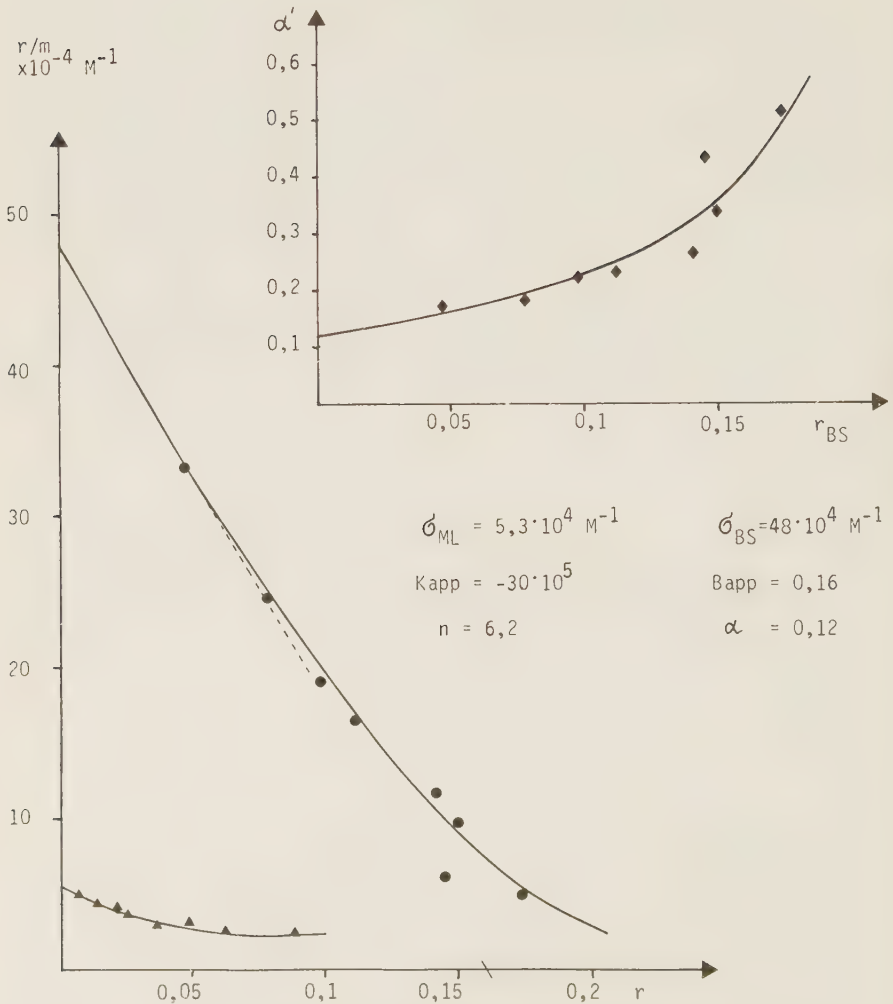
Ersetzt man beide Amidinogruppen durch Aminomethylreste (Nr. 11), so bleibt zwar der stark basische Charakter erhalten, jedoch fehlt die einebnende Mesomeriemöglichkeit des kationischen Endes mit dem Indolring. Offenbar wird ein planares, starres, biskationisches Molekül bevorzugt gebunden, denn bei Nr. 11 fällt die Affinität auf ein Fünfzigstel von DAPI bei gleichzeitigem Verlust der Spezifität.

Eine Veränderung des Abstandes der Amidinogruppen durch Einschub einer Phenoxygruppe (Nr. 12) bewirkt kaum eine Verände-

rung der Bindungsparameter, da eine verstärkte Bindungsmöglichkeit durch den zusätzlichen Phenylring durch die Unterbrechung der Konjugation kompensiert wird. Die durch Differentialverteilung erhaltenen Werte stimmen gut mit Literaturwerten überein ⁴²⁾.

Der Austausch der Imidazolingruppe in 4'-Position gegen einen Triaminotriazinrest (Nr. 13) verursacht im Vergleich zu DIPI (Nr. 4) eine vergrößerte Affinität bei etwas verminderter Spezifität. Die im Vergleich zu 192/188 wesentlich lipophile Verbindung kann durch den Aminotriazinrest die Imidazolingruppe in 4'-Stellung ersetzen, da ein konjugiertes System mit potentieller Guanidinstruktur vorhanden ist.

Abbildung: Nr. 5

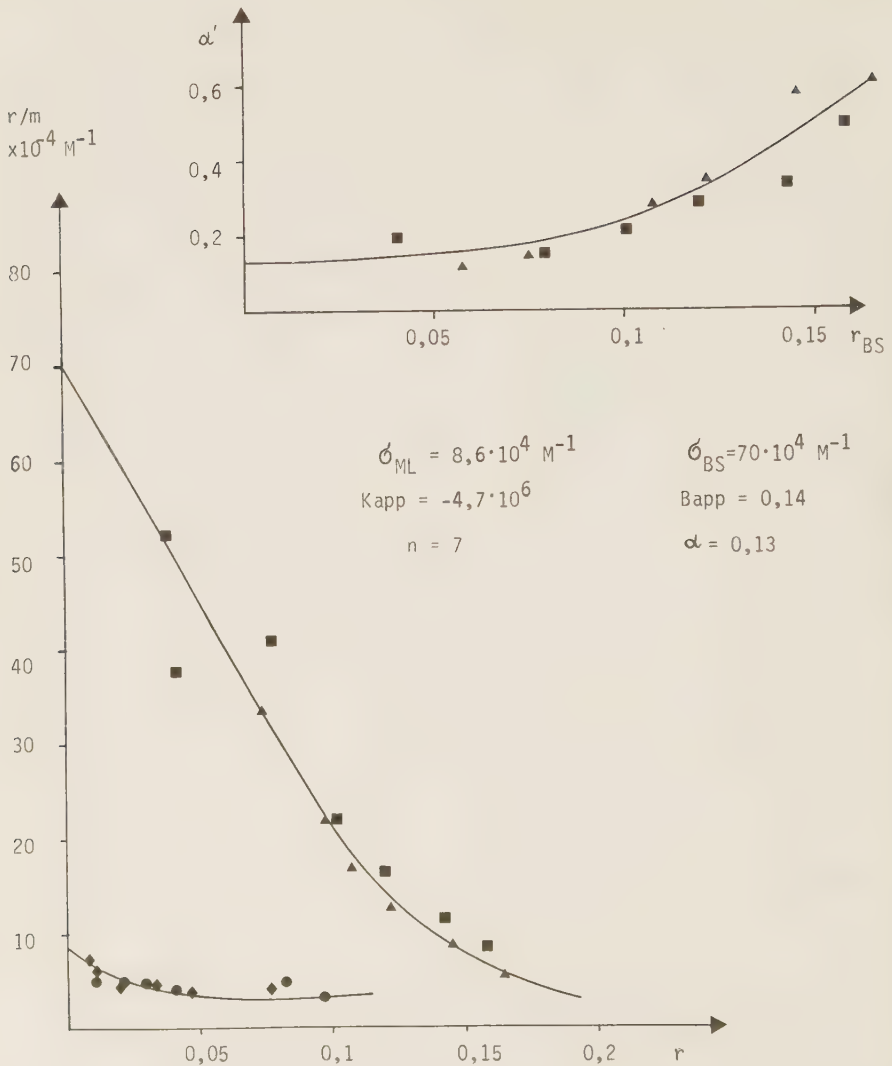


Bindungsisothermen nach der Verteilungsmethode für 2-[4-(2-Imidazolin-2-yl)-phenyl]-6-(2-imidazolin-2-yl)indol-dihydrochlorid (Nr. 4) an *Micrococcus luteus*-DNA $\blacktriangle$ und *Bacillus subtilis*-DNA $\bullet$.
 Oben eingesetzt die graphische Darstellung zur Ermittlung des Spezifitätsparameters α (Erläuterungen S. 101 ff.).



Abbildung Nr. 6: Verteilungsverhalten von 192/188 (Nr. 4) zwischen Hexanol-(1) und BPES

Abbildung: 7



Bindungsisothermen für 2-[4-(4-Amidinophenoxy)phenyl]-6-indolylcarboxamidindihydrochlorid (Nr. 12) an *Micrococcus luteus*-DNA (◆ Verteilung, ● Dialyse) und *Bacillus subtilis*-DNA (■ Verteilung, ▲ Dialyse). Oben eingesetzt die graphische Darstellung zur Ermittlung des Spezifitätsparameters α (■ Verteilung, ▲ Dialyse).

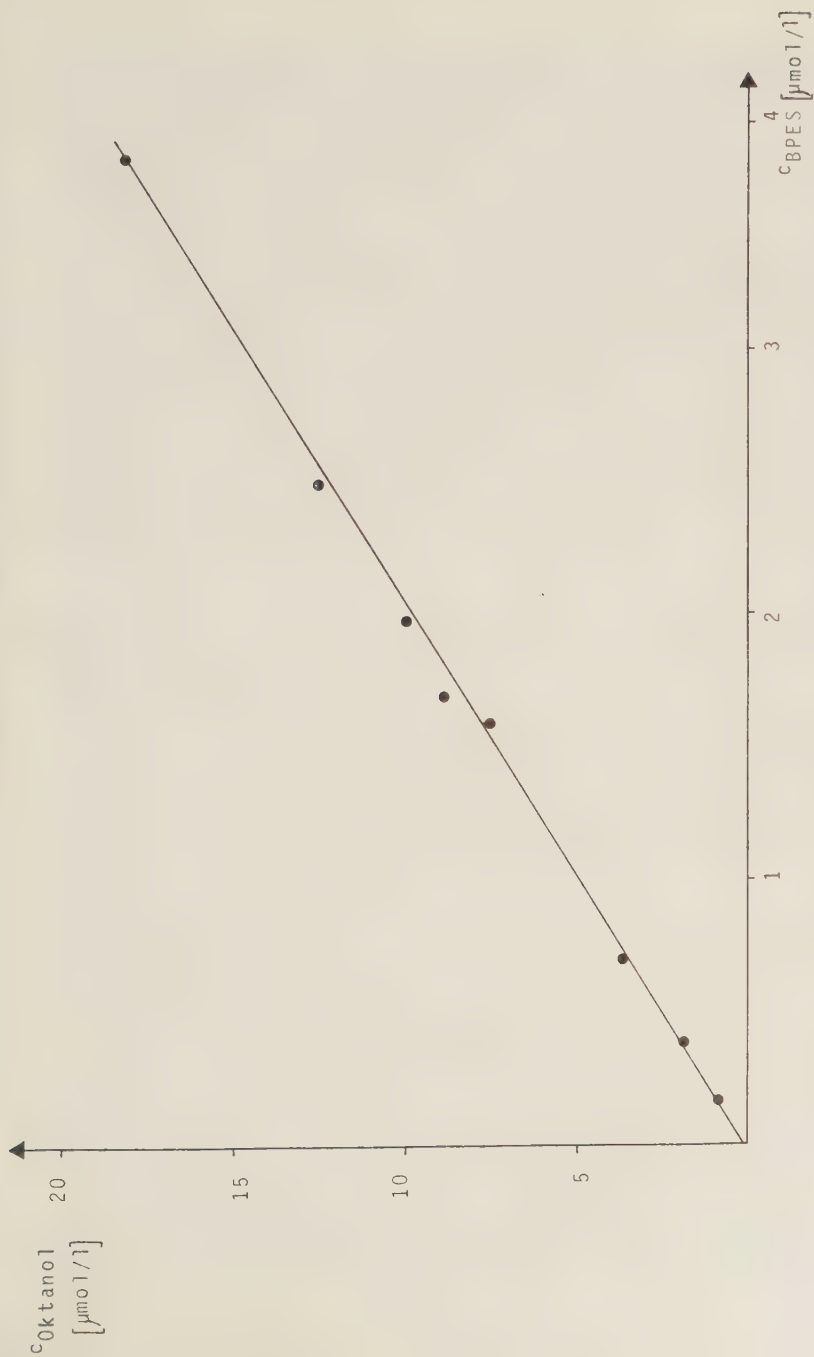


Abbildung 8: Verteilungsverhalten von 186/134 (Nr. 12) zwischen Oktanol-(1) und BPES

3.1.3.2. Verschieden substituierte Indole

Durch Weglassen des Phenylringes von DAPI (Nr. 3) gelangt man zum "Stummelamidin" (Nr. 14), das sich durch eine Abnahme der Affinität um den Faktor 10 im Vergleich zu DAPI auszeichnet, wobei die Spezifität nur geringfügig schlechter ist. Ersetzt man die Amidin- durch eine Imidazolingruppe (Nr. 15), so nimmt die Affinität nochmals um das Zweifache ab bei vergleichbarer Spezifität zu Nr. 14. Eine 3-Aminogruppe in Nr. 19 ändert die Bindungsspezifität von Nr. 14 ebenfalls wenig wie bei Nr. 5 und 3. Eine Verschiebung der Amidingruppe von Position 6 zu Position 5 (Nr. 18) äußert sich in einem Verlust der Spezifität bei etwas verminderter Affinität im Vergleich zu Nr. 14, was auf sterische Effekte zurückzuführen sein dürfte, wie auch ähnliche Befunde in der 2-Phenylindolreihe belegen ⁴²⁾.

Wird bei Verbindung Nr. 15 in Position 2 zwischen die Imidazolin- und Indolgruppierung eine Methylengruppe eingeschoben, so gelangt man zu der Verbindung Nr. 17, die im Vergleich zu Nr. 15 kaum mehr Affinität zur DNA aufweist. Die Spezifität geht ebenfalls verloren. Ein Grund für die schwache Affinität ist sicher wieder wie bei Nr. 11 darin zu suchen, daß durch die Methyleneinschiebung das Molekül nicht mehr planar und starr ist.

Testet man das Bindungsverhalten eines Indols (Nr. 16), das in 2- und 6-Stellung durch eine Amidoximgruppe substituiert ist, so stellt man keine Affinität zur DNA mehr fest. Die Ursache dürfte darin liegen, daß die Amidoximgruppen bei pH=7 praktisch nicht protoniert sind, und somit ein entscheidendes Kriterium für eine Bindung an DNA wegfällt.

Tauscht man die Amidingruppe in 2-Stellung von Nr. 14 gegen eine Carbaldehydamidinohydrazongruppe aus, so gelangt man zu Nr. 20, mit ganz ähnlicher Affinität und etwas verminderter

Spezifität, wobei durch Einführung einer zusätzlichen 3-Aminogruppe bei Nr. 21 sich wieder keine starke Veränderung zeigt, während mit der Nitrogruppe in 3-Stellung bei Nr. 22 wieder wie bei Nr. 7 die Spezifität deutlich absinkt.

Ist die 2-Stellung von Nr. 14 mit einer Carbaldehydamidino-phenylhydrazongruppe (Nr. 23) besetzt, so ist ein deutlicher Affinitätsanstieg feststellbar und gemäß der Länge des Moleküls wird die Affinität von DAPI wegen der zusätzlichen Doppelbindung und zwei Stickstoffatomen sogar übertroffen. Substituiert man Nr. 23 mit einer Nitrogruppe in 3-Stellung, so sinkt die Affinität und die Spezifität im Vergleich zur unsubstituierten Verbindung wieder etwas ab. Eine Aminogruppe in 3-Stellung von Nr. 23 lieferte ein Molekül, das zu instabil für eine Messung war.

Allgemein ist zu sagen, daß sich Nitroverbindungen durch eine relative Schwerlöslichkeit in BPES auszeichneten, weshalb Cacodylatpuffer verwendet wurde, mit dem sich höhere Konzentrationen an Ligand erzielen ließen. Bei manchen Verbindungen ist das konjugierte System relativ klein, so daß die Absorptionsmaxima im kurzwelligen Bereich liegen (Nr. 8, 11, 15, 16, 17, 18) und eine Überlagerung mit der Absorption von DNA stattfinden könnte. Diese Schwierigkeit wurde dadurch umgangen, daß die Konzentration der DNA-haltigen Lösung des Liganden gegen eine DNA-Lösung gleicher Konzentration als Leerwert gemessen wurde, wodurch die störende Eigenabsorption der DNA ausgeglichen werden konnte.

3.1.3.3. Substituierte Benzimidazole

Allgemein läßt sich feststellen, daß substituierte Benzimidazole in ihrer Bindungsfähigkeit an DNA eine Zwischenstellung

zwischen Benzofuran- und Indolanaloga einnehmen. Die Spezifität ist durchaus mit der der Indole vergleichbar.

So zeigt ein Vergleich von dem Benzimidazol Nr. 25 mit dem analogen DAPI (Nr. 3) eine um den Faktor 4 verminderte Affinität bei etwas geringerer Spezifität. Befindet sich zwischen dem Benzimidazol und dem Phenylring eine Iminogruppe wie in Nr. 26, so resultiert ein ähnliches Bindungsverhalten wie bei der Verbindung ohne Iminogruppe. Beim Wegfall der Amidinogruppe in 5-Stellung des Benzimidazols und einer Substitution in 2-Stellung mit einem 6-Amidinoindol resultiert die bei pH=7 monokationische Verbindung Nr. 27 mit geringer Affinität und Spezifität.

Eine Verbrückung zweier 5-Amidinobenzimidazole in 2-Stellung über eine Iminogruppe enthält eine Präparation Nr. 28 mit schwacher Affinität zu DNA.

Die Kombination eines Benzimidazols mit einem Benzofuran stellt die Verbindung Nr. 29 dar, mit verminderter Spezifität verglichen mit Nr. 25 und deutlich verminderter Affinität verglichen mit den analogen Indolverbindungen Nr. 48 und Nr. 30.

Bei Nr. 30 war der freie Anteil bei niedrigen Beladungswerten nur noch durch Fluoreszenzmessung zu ermitteln.

Eine Verlängerung von Nr. 30 um einen Phenylring zu Nr. 31 läßt die Affinität abermals um den Faktor 2,5 ansteigen unter Verlust von Spezifität. Das vergleichbare Indolderivat Nr. 50 zeigt wiederum sechsfach höhere Affinitätswerte bei vergleichbarer Spezifität. Bindungsstudien bei Nr. 31 wurden durch Verteilungsmessungen zwischen Hexanol-(1) und BPES gemacht, da bei so hohen Affinitäten eine ungestörte Ermittlung des freien Anteils bei der Dialyse nicht mehr möglich ist.

3.1.3.4. Vinylverbrückte biskationische Verbindungen

Bei dieser Gruppe von Verbindungen handelt es sich um Moleküle, die sich besonders bei symmetrischem Aufbau durch Schwerlöslichkeit auszeichnen, die gepaart ist mit einer hohen Affinität zur DNA. Dadurch treten bei relativ niedrigen Beladungswerten Niederschläge auf, und die Membrangängigkeit ist behindert, weshalb zur Bestimmung von Bindungsdaten die Differentialverteilungsmethode ausgearbeitet werden mußte.

Die Verbindungen zeigen mittlere Spezifitäten mit einer Beanspruchung von 2 Adenin-Thymin Basenpaaren zur optimalen Bindung und Affinitäten, die vom jeweiligen Heterozyklus abhängig im Verhältnis von etwa 1:100 variieren.

Die symmetrischen Bisbenzofuranderivate Nr. 33 mit Amidin- und Nr. 32 mit Imidazolingruppen binden relativ schwach an DNA. Wird ein Benzofuran gegen ein Benzimidazol ersetzt, so nimmt bei Nr. 34 die Affinität um den Faktor 4 zu und auch die Spezifität steigt etwas an. Wird ein Benzofuran gegen ein Indol ersetzt, so nimmt bei Nr. 35 die Affinität um den Faktor 25 zu und auch die Spezifität steigt etwas an, was bei der zugehörigen Imidazolinverbindung Nr. 36 besonders deutlich wird. Führt man bei Nr. 36 im Indolheterozyklus in Position 3 eine Aminogruppe ein, so nimmt bei Nr. 37 die Affinität wenig und die Spezifität deutlich ab.

Eine herausragende Affinität weist Verbindung Nr. 38 auf, die sich aus zwei vinylverbrückten Indolen symmetrisch zusammensetzt. Die Affinität steigt im Vergleich zum analogen Indol-Benzofuran Nr. 36 nochmals um den Faktor 6 an. Eine Substitution dieser Verbindung mit einer Aminogruppe in 3-Stellung liefert bei Nr. 39 etwas erniedrigte Affinität. Die Bestimmung so hoher Affinitäten läßt sich nur im Bereich relativ geringer Beladung durchführen, da sonst eine Ausfällung der

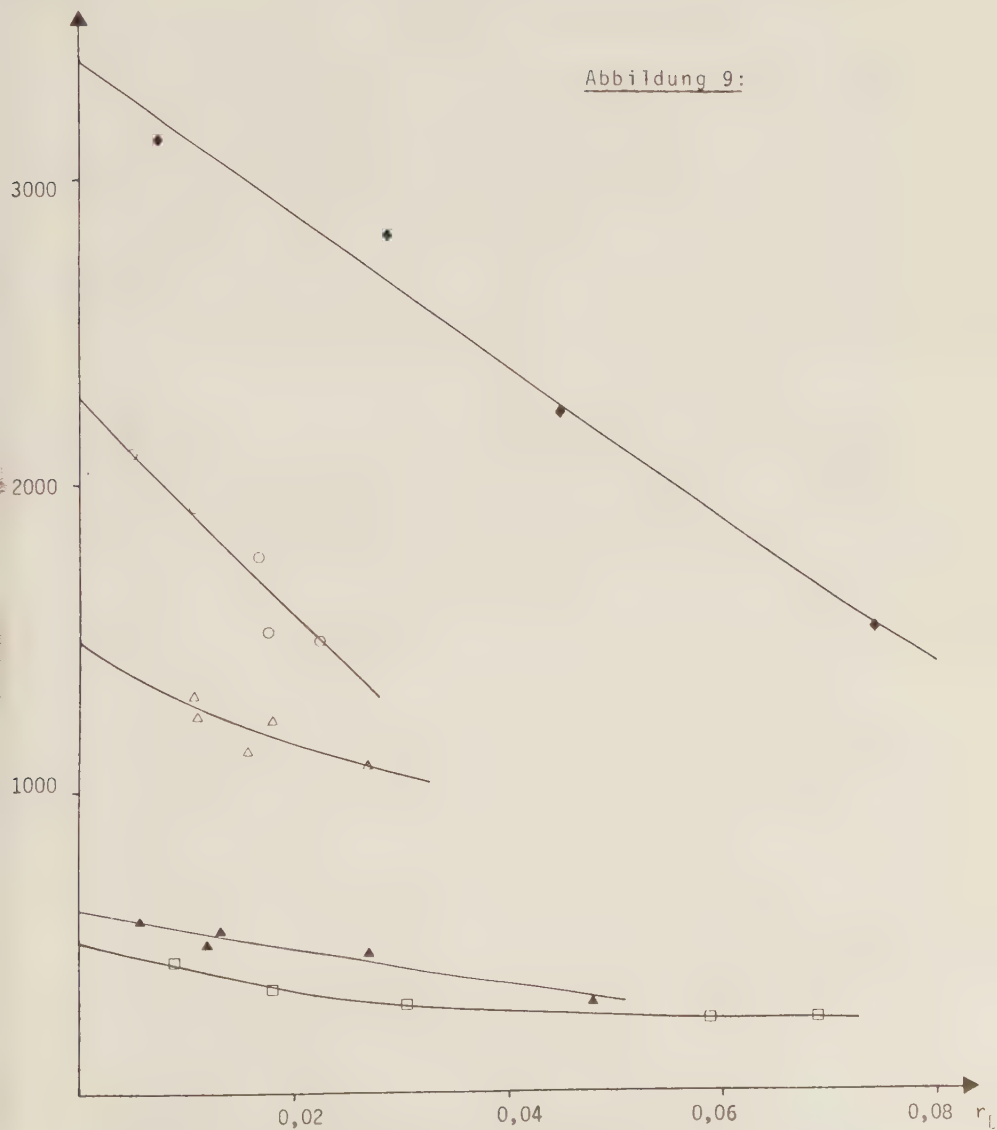
DNA erfolgt, die durch Verdrängung der Wasserhülle und Versteifung der DNA verursacht wird.

Werden zwei Indolringe in 2- und 6-Stellung über eine Vinylgruppe verbrückt, so sinkt bei Nr. 40 die Affinität um die Hälfte, werden beide Indolringe in 6-Stellung verbrückt, so sinkt bei Nr. 41 die Affinität gar um den Faktor 50 im Vergleich zu Nr. 38. Ein ähnliches Verhalten läßt sich beim Vergleich von Nr. 42 und Nr. 43 feststellen. Bei der in 2-Stellung am Indolring vinylverbrückten Phenoxyerweiterung liegt die Affinität um den Faktor 3 bei gleicher Spezifität höher als bei Nr. 43 mit der Vinylbrücke in 6-Stellung. Aus dem oben Gesagtem geht hervor, daß die Bindungsaffinität nicht nur vom Abstand der kationischen Endgruppen und der Art des Heterozyklus abhängt, sondern auch von den Entfernungen des Heteroatoms von den beiden kationischen Endgruppen.

Das gegen *T. brucei* aber nicht gegen *T. congolense* wirksame Stilbamidin (Nr. 44) zeigt im Vergleich zu DAPI (Nr. 3) eine relativ schwache Affinität zu DNA und geringere Spezifität. Durch eine Monosubstitution in 2-Stellung mit einer Aminogruppe wird bei Nr. 45 die Affinität nur unwesentlich verändert, die Spezifität steigt etwas, während eine zweite Aminogruppe in 2'-Stellung bei Nr. 46 unveränderte Bindungsparameter im Vergleich zu Nr. 45 zeigt, was wiederum für den geringen Einfluß von Aminogruppen spricht.

$r_{BS/m}$
 $\times 10^{-4} M^{-1}$

Abbildung 9:



Mit der Differentialverteilungsmethode ermittelte Bindungsisothermen
 für die am stärksten an *Bacillus subtilis*-DNA anlagernden Verbindungen
 $\blacklozenge$ Nr. 51, $\circ$ Nr. 50, $\triangle$ Nr. 52, $\blacktriangle$ Nr. 38, $\square$ Nr. 49

3.1.3.5. Direkt verknüpfte heteroaromatische biskationische Verbindungen

Verknüpft man zwei Indole direkt in 2- und 6-Stellung bei Nr. 47, so steigt zwar die Affinität im Vergleich zu DIPI (Nr. 4) um den Faktor 2,5 unter fast völligem Verlust der Spezifität, fällt jedoch ab gegenüber dem vinylverbrückten Nr. 40. Ähnliche Ergebnisse liefert das analoge Indol-Benzofuran-Derivat Nr. 48. Verknüpft man zwei Indole direkt in 2,2-Stellung bei Nr. 49, so steigt die Affinität im Vergleich zur 2,6-verknüpften Verbindung (Nr. 47) abermals um den Faktor 4, liegt aber wiederum niedriger als bei der entsprechenden vinylverbrückten Verbindung Nr. 38.

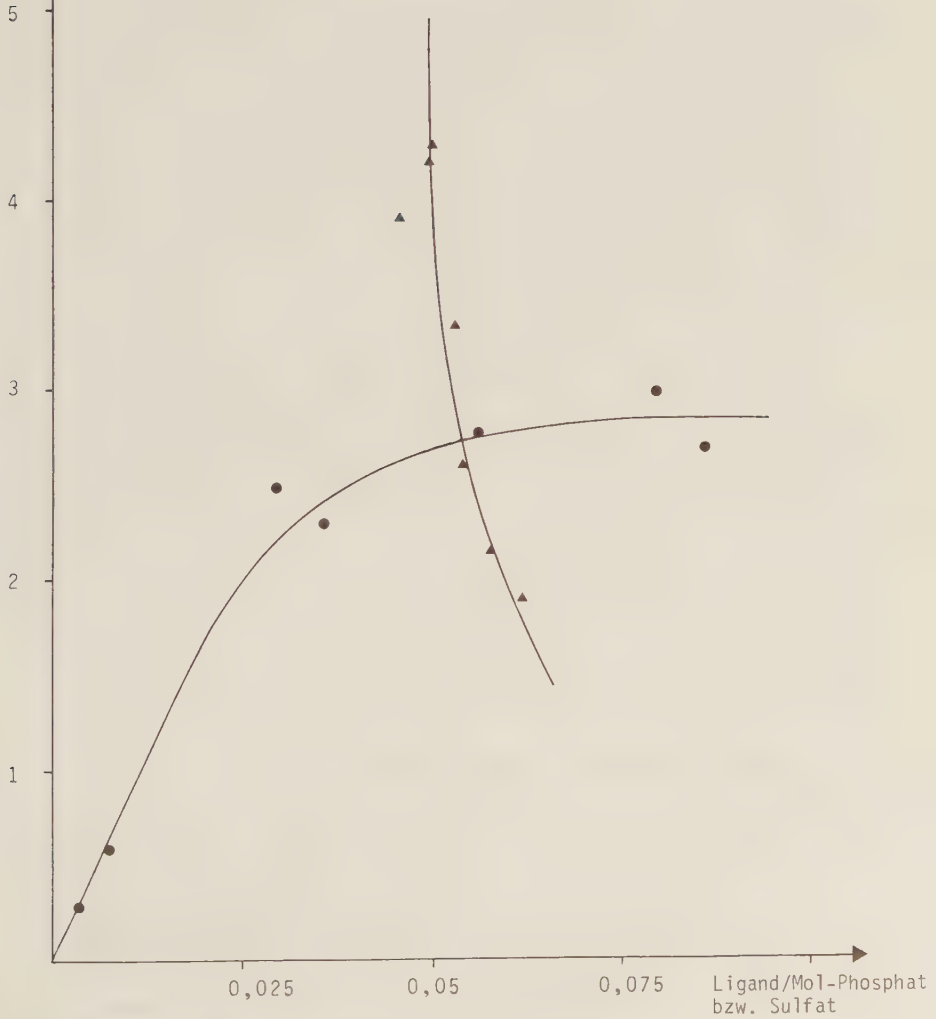
Wird Nr. 47 noch um eine Phenylgruppe verlängert, so steigt bei Nr. 50 die Affinität um das 18-fache an; wird Nr. 47 noch um einen Indolring verlängert (Nr. 51), so kumuliert die Affinität bei dem etwa dreißigfachen Wert. Eine Verlängerung von Nr. 47 um einen Benzofuranring bewirkt bei Nr. 52 nur einen Anstieg der Affinität auf den etwa zehnfachen Wert.

3.1.4. Bindungsverhalten von DAPI an DNA/Dextransulfat

Ersetzt man bei der Gleichgewichtsdialyse in der einen Kammer die DNA durch eine Dextransulfatlösung mit dem Molekulargewicht 500000, so kann man das Bindungsverhalten von DAPI an beide Makromoleküle gleichzeitig studieren. Hierbei hat die DNA eine Konzentration von $3,2 \cdot 10^{-4}$ Mol-Phosphat/Liter, während Dextransulfat in einer Konzentration von $3,88 \cdot 10^{-4}$ Mol-Sulfat/Liter eingesetzt wird. Untersucht man nun das Bindungsverhalten im Bereich des Beladungsgrades $r=0,05$ bis $0,1$ Mol Ligand/Mol-Phosphat bzw. Sulfat, so findet man um $r=0,08$ eine etwas stärkere Bindung von DAPI an Dextransulfat, im Bereich von $r=0,05$ ist ungefähr gleichviel gebunden, während bei einer weiteren Abnahme die Beladung der DNA vorherrscht, wohingegen diejenige von Dextransulfat ständig abfällt und gegen Null extrapoliert werden kann. Die Gründe für dieses

$\frac{r}{m} \times 10^{-4}$
 M^{-1}

Abbildung 10



Bindungsisothermen für DAPI (Nr. 3) an Dextransulfatlösung ● ($c=3,88 \cdot 10^{-4}$ Mol-Sulfat/l) und an *Bacillus subtilis*-DNA ▲ ($c=3,2 \cdot 10^{-4}$ Mol-Phosphat/l)

Verhalten dürften darin zu suchen sein, daß bei relativ hoher Beladung elektrostatische Wechselwirkungen für den Hauptanteil des gebundenen Liganden verantwortlich sind. Hier kann nun genauso wie durch Phosphat in der DNA durch die Sulfatgruppen im Dextransulfat eine Bindung stattfinden, wobei sogar an Dextransulfat etwas mehr Ligand gebunden werden kann. Je weiter man nun die Beladung verringert, um so mehr treten quantitativ die spezifischen Bindungsstellen des Liganden an die Adenin-Thymin Basenpaare der DNA in Erscheinung. Da Dextransulfat keine spezifischen Bindungsstellen zur Verfügung hat, resultiert eine Abnahme der Bindungsfähigkeit für den Liganden bei niedrigen Beladungsgraden im Vergleich zur DNA, wodurch trotz der Abnahme der Gesamtligandenkonzentration in der DNA-Kammer immer eine ähnliche Beladung der DNA vorliegt, die einfach aus der starken Verschiebung der Affinitätswerte resultiert. Damit läßt sich zeigen, daß das polyanionische Dextransulfat, obwohl es keine spezifischen Bindungsstellen für DAPI besitzt, dieses trotzdem in gewissem Ausmaß bindet, und aus dieser Sicht vielleicht zur Entwicklung eines Depotpräparates mit verzögerter Freisetzung und damit geringerer Toxizität von DAPI verwendet werden könnte, wie es für die anderen biskationischen Trypanocide Berenil^R, Antrycide^R und Samorin^R beschrieben worden ist ^{99,100}).

3.2. Ergebnisse der Gelelektrophorese

3.2.1. Photographische Aufnahmen

Zur Untersuchung der Bindungsart wurden die Verbindungen Nr. 4, 6, 14, 19, 38 und 39 ausgewählt nach ihrer unterschiedlichen Affinität zu DNA, nach den Endgruppen -Am oder -Im und nach dem Vorhandensein einer Aminogruppe in der 3-Stellung des Indolringes, da diese 3-Aminoindole bei der Chromosomenfärbung nach S c h n e d l ¹⁰¹) ein von den unsubstituierten Verbindungen abweichendes Bändermuster zeigten, was den Verdacht auf die Möglichkeit einer anderen Bindungsart geweckt hatte.

Als interkalierende Vergleichsverbindung wurde Ethidium gewählt (Formel S. 7).

Auf den photographischen Aufnahmen (Abb. 11-17) der gefärbten Gele kann man deutlich erkennen, daß bei der interkalierenden Vergleichsverbindung Ethidium mit steigender Ligandenkonzentration die weiter wandernde superhelikale Struktur der DNA aufgehoben wird, eine weniger weit wandernde offenzirkuläre Form resultiert, und bei höherer Beladung wiederum superhelikale Strukturen auftreten. Weiterhin kann man sehen, daß in der DNA-Präparation eine offenzirkuläre Form bereits vorliegt, die ein von der Ethidiumkonzentration fast unabhängiges Wanderungsverhalten zeigt. Man kann nur eine monotone Veränderung zu kürzeren Laufstrecken hin beobachten, die damit zusammenhängt, daß mit der ansteigenden Ethidiumkonzentration eine Neutralisation der negativen Ladungen der DNA verbunden ist, was sich in einer Abnahme der elektrophoretischen Wanderung zur Anode bemerkbar macht ¹⁰²).

Bei allen sechs untersuchten biskationischen Verbindungen läßt sich kein Effekt feststellen, der auf eine Interkalation hindeuten würde. Man findet nur die oben beschriebene monotone Abnahme der elektrophoretischen Beweglichkeit auf Grund der Ladungsneutralisation.

Bei manchen Aufnahmen kann man neben der offenzirkulären und geschlossen-zirkulären superhelikalen Form noch weitere weniger deutliche Banden erkennen, die sich durch geringere Wanderungsstrecken auszeichnen. Diese Banden stammen daher, daß Dimere des Plasmids pBr 322 auftreten, die dann die gleichen Effekte wie die Monomeren zeigen ^{102,103}).

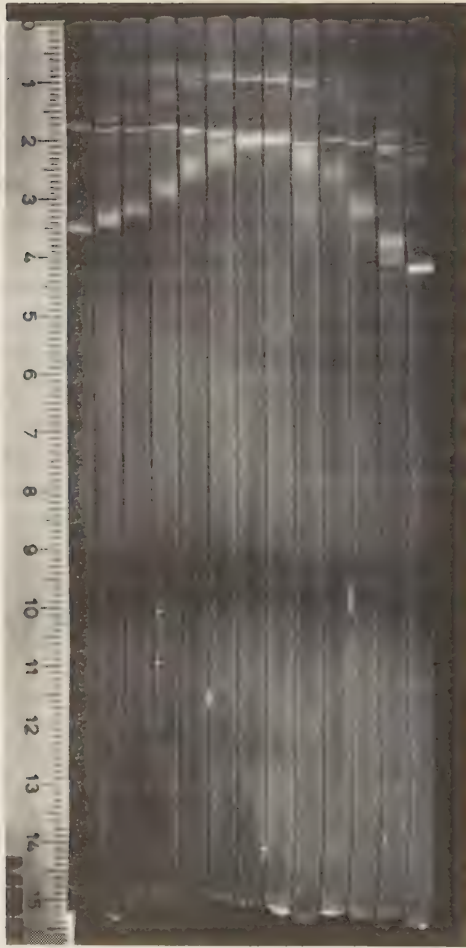


Abbildung 11: Ethidium

Gelelektrophorese von pBr 322 Plasmid-DNA in Gegenwart von Ligand, dessen Konzentration in den Gelen von rechts nach links ansteigt (Laufrichtung von oben nach unten).

c Ethidium = 0 - $4,84 \cdot 10^{-7}$ Mol/l

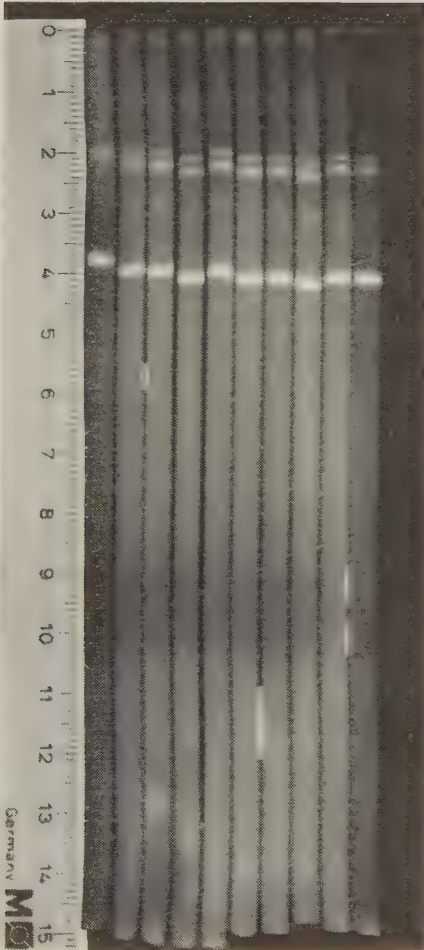


Abbildung 12: Nr. 14

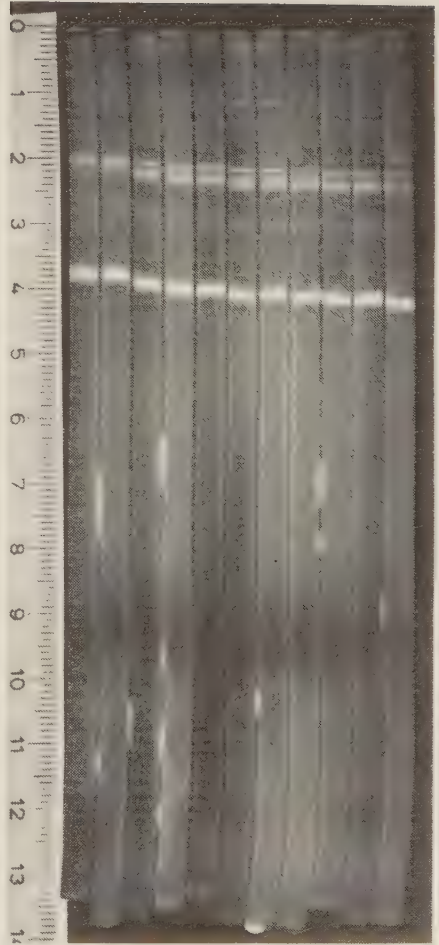


Abbildung 13: Nr. 19

Gelelektrophorese von pBr 322 Plasmid-DNA in Gegenwart von Ligand, dessen Konzentration in den Gelen von rechts nach links ansteigt (Laufriichtung von oben nach unten).

Nr. 14: $c = 0 - 1,2 \cdot 10^{-5} \text{ Mol/l}$

Nr. 19: $c = 0 - 1,0 \cdot 10^{-5} \text{ Mol/l}$

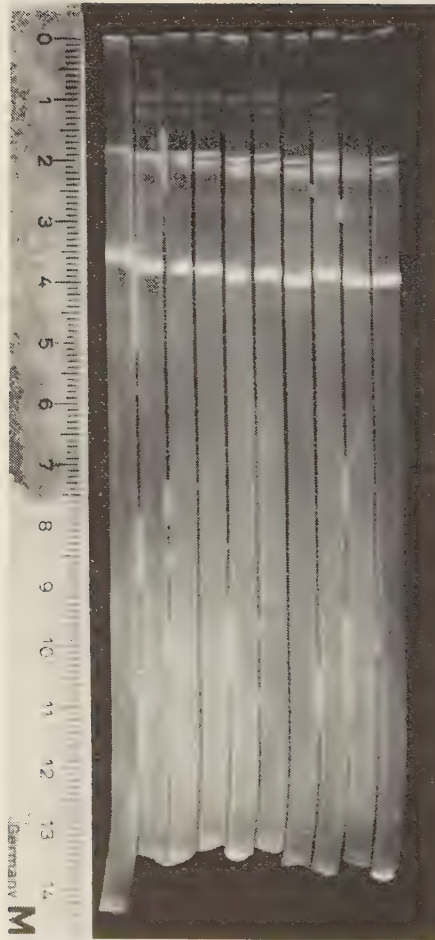


Abbildung 14: Nr. 4

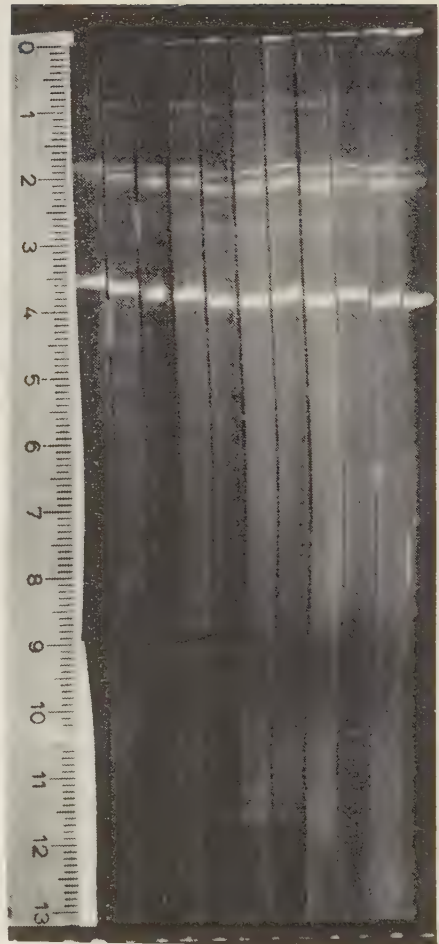


Abbildung 15: Nr. 6

Gelelektrophorese von pBr 322 Plasmid-DNA in Gegenwart von Ligand, dessen Konzentration in den Gelen von rechts nach links ansteigt (Laufrichtung von oben nach unten)

Nr. 4: $c = 0 - 3,01 \cdot 10^{-7} \text{ Mol/l}$

Nr. 6: $c = 0 - 5,27 \cdot 10^{-7} \text{ Mol/l}$

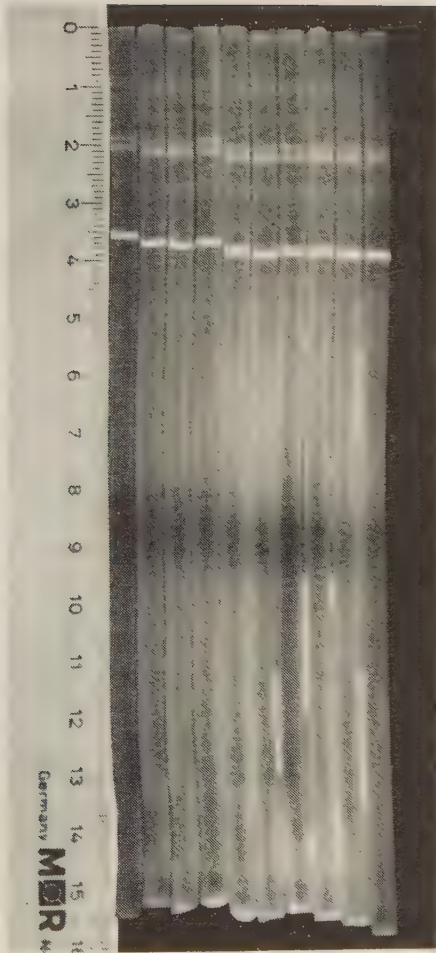


Abbildung 16: Nr. 38

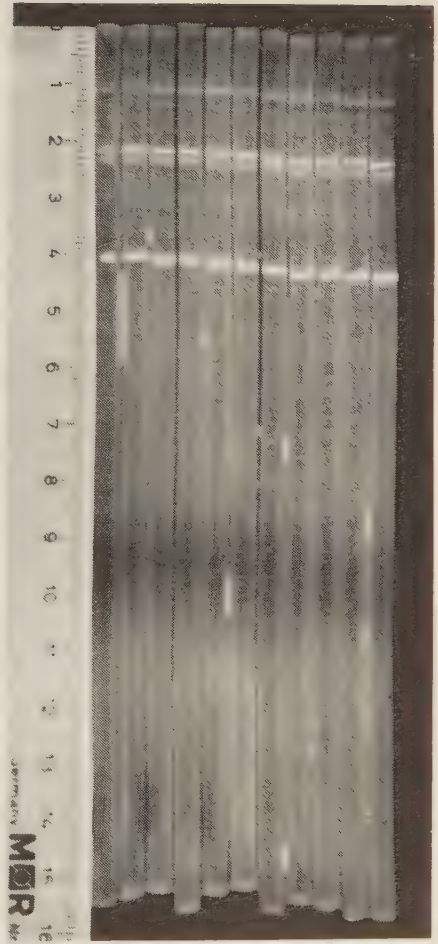


Abbildung 17: Nr. 39

Gelelektrophorese von pBr 322 Plasmid-DNA in Gegenwart von Ligand, dessen Konzentration in den Gelen von rechts nach links ansteigt (Laufrichtung von oben nach unten)

Nr. 38: $c = 0 - 7,0 \cdot 10^{-8} \text{ Mol/l}$

Nr. 39: $c = 0 - 1,0 \cdot 10^{-7} \text{ Mol/l}$

3.2.2. Graphische Auswertung 97)

Die Laufstrecke der jeweiligen DNA-Bande wird auf den photographischen Aufnahmen ausgemessen und das Ergebnis graphisch dargestellt, wobei die Konzentration des Liganden im Gel als Abszisse gegen ΔS als Ordinate aufgetragen wird. ΔS ist die Differenz der Laufstrecke zwischen kovalent-geschlossener-zirkularer (S_{cc}) und offen-zirkularer DNA (S_{oc}) dividiert durch einen Retardierungsfaktor R_f .

$$\Delta S = (S_{cc} - S_{oc}) / R_f$$

R_f ist definiert als der Quotient der Laufstrecke der offen-zirkularen Form bei einer Ligandenkonzentration x in Gel ($S_{oc}x$) und der Laufstrecke der offen-zirkularen Form ($S_{oc}o$), wenn kein Ligand im Gel vorhanden ist.

$$R_f = S_{oc}x / S_{oc}o$$

Der Retardierungsfaktor wird eingeführt, um die verminderte Beweglichkeit der DNA bei höherer Beladung auf Grund der Ladungsneutralisation auszugleichen.

Aus Abb.17a kann man ersehen, daß sich für Ethidium eine parabelförmige Kurve ergibt, die ihren Scheitel bei $1,25 \cdot 10^{-7}$ Mol/l Ethidium besitzt, d. h. bei dieser Konzentration ist die Superhelikalität der DNA völlig verschwunden, und es liegt nur noch offen-zirkulare Form vor, während bei höheren Konzentrationen die Laufunterschiede wieder zunehmen, d. h. erneut eine Superhelikalität auftritt.

Als Beispiel wurde noch 297/150 eingezeichnet, eine nicht interkalierende Verbindung, was sich darin äußert, daß im Konzentrationsbereich $0 - 5,2 \cdot 10^{-7}$ Mol/l nur gleiche Laufunterschiede (2,35-2,55 mm) zwischen geschlossen-zirkularer und offen-zirkularer DNA beobachtet werden können.

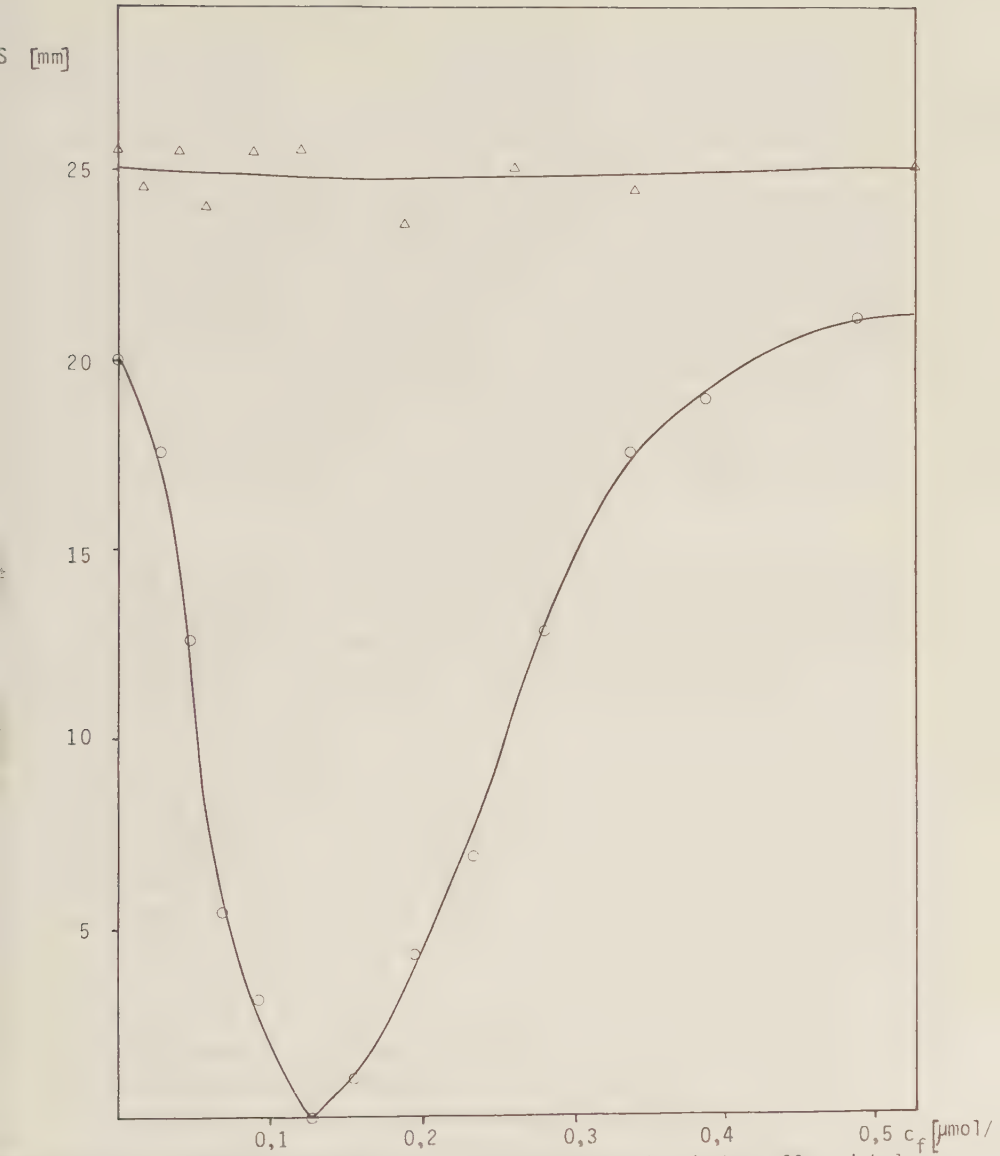


Abbildung: 17a Gelelektrophoretischer Laufunterschied ΔS zwischen offen-zirkulärer und geschlossen-zirkulärer pBr 322 Plasmid-DNA bei verschiedenen freien Konzentrationen c_f im Gel. O Ethidium Δ 297/150 (Nr. 6)

3.3. Diagnostische Anwendbarkeit

3.3.1. Fluoreszenzverhalten

Das Fluoreszenzverhalten verschiedener biskationischer Verbindungen wurde untersucht, indem zu einer DNA-Lösung bestimmter Konzentration, nach Art einer Titration, immer eine bestimmte Menge Ligand zugesetzt wurde. Gemessen wurde die relative Fluoreszenzintensität im Emissionsmaximum, während im Excitationsmaximum angeregt wurde. Bei den untersuchten Verbindungen kann man auf Grund der erheblichen Bindung an DNA davon ausgehen, daß zumindest im niedrigen Beladungsbereich eine fast quantitative Anlagerung an die jeweilige DNA stattfindet, und somit der freie Anteil vernachlässigt werden kann.

Trägt man nun in einem Diagramm die relativen Fluoreszenzintensitäten gegen die zugesetzte Menge an Ligand pro Basenpaar der DNA auf, so kann man feststellen, inwieweit die Fluoreszenzeigenschaften der untersuchten Verbindung von der Basenzusammensetzung der DNA abhängig sind. Bei DAPI (Nr. 3, Abb. 18) ist zu erkennen, daß die relativ Adenin-Thymin reiche DNA von *Clostridium perfringens* (73,5 % AT) eine wesentlich stärkere Fluoreszenzintensität zeigt als die DNA von *Bacillus subtilis* (56 % AT), und gar eine zehnfache von *Micrococcus luteus* (28 % AT) d. h. bei einer gleichen Konzentration an Ligand und DNA ist die Fluoreszenzintensität stark von der Basenzusammensetzung der DNA abhängig.

Für das extrem affine Nr. 51 (Abb. 19) ergibt sich zumindest im höheren Beladungsbereich ein ähnliches Bild, wobei bei höherer Ligandenkonzentration eine Abnahme der Fluoreszenz zu beobachten ist, die auf Quencheffekte durch Bildung von DNA-Ligand Agglomeraten beruhen könnte.

Bei Nr. 40 (Abb. 20) ist die Abhängigkeit der Fluoreszenzintensität von der Basenzusammensetzung wesentlich weniger aus-

geprägt und bei Nr. 42 (Abb. 21) ist trotz maximaler AT-Spezifität und hoher Affinität die beobachtete Fluoreszenz von der Basenzusammensetzung nahezu unabhängig.

Neben der Basenspezifität und Affinität ist für die Fluoreszenzfärbung von Chromosomen offenbar entscheidend, inwieweit bei der Bindung an DNA eine Fluoreszenzsteigerung im Vergleich zum ungebundenen Liganden zu beobachten ist. Hierzu wurde das Fluoreszenzemissionsspektrum des Liganden einmal in BPES-Puffer und das andere Mal in DNA-haltiger Lösung bestimmt, wobei im Excitationsmaximum angeregt wurde. Für die Untersuchung wurde DNA von *Bacillus subtilis* verwendet und in einer Menge zugesetzt, daß 0,05 Mol Ligand pro Mol Basenpaar vorhanden war, d. h. der Ligand war praktisch quantitativ an DNA gebunden.

Beim Vergleich der relativen Skalenteile der Fluoreszenz (I_{rel}) fällt auf, daß der DNA Zusatz bei Nr. 42 (Abb. 22) nur eine geringe Steigerung der Fluoreszenz etwa um den Faktor 1,6 und bei der Verbindung Nr. 40 (Abb. 23) um den Faktor 3,5 bewirkt.

Wurde für DAPI (Nr. 3, Abb. 24) eine Steigerung auf ungefähr das 35-fache gefunden, so beträgt sie für Nr. 51 (Abb. 25) gar das 340-fache, was auf Aggregation beruhen könnte. Bei der Bestimmung der Dampfdruckerniedrigung wäßriger Lösungen der Dihydrochloride von DAPI (Nr. 3) und Nr. 51 wurden tatsächlich für Nr. 51 anstatt nach der eingesetzten Konzentration zu erwartender 17,5 mosmol/kg nur 12 mosmol/kg gefunden, während Nr. 3 anstatt 36,6 mosmol/kg 34 mosmol/kg lieferte. Zusammenfassend kann man feststellen, daß obige Verbindungen, obwohl sie ihre bis-kationische Struktur, das Indol als Heterozyklus, und eine starke Bindung an DNA gemeinsam haben, bei der Komplexbildung mit DNA sehr unterschiedliche Fluoreszenzeigenschaften aufweisen. Als Fluorochrome besonders geeignet sind Verbindungen, welche möglichst große Fluoreszenzsteigerung bei Zusatz von DNA zeigen.

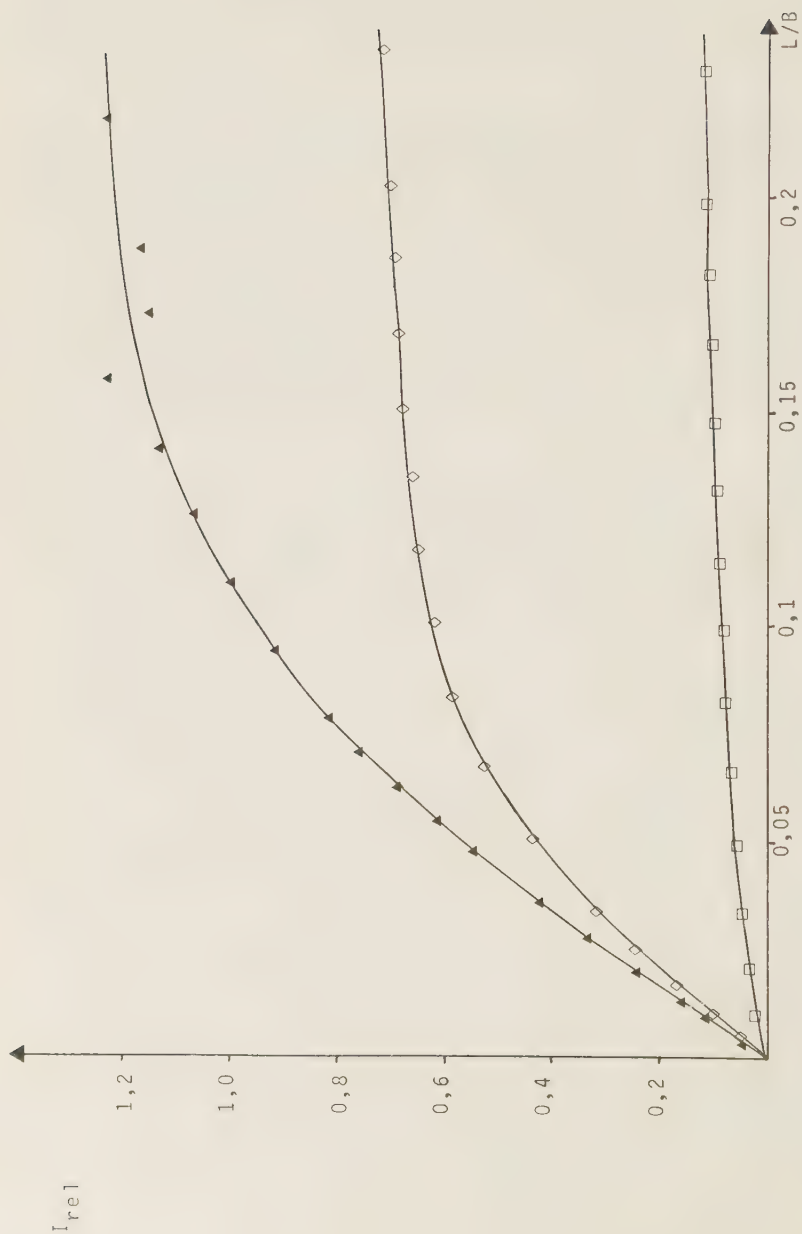


Abbildung 18:

Relative Fluoreszenz (I_{rel}) im Emissionsmaximum von 102/198 (Nr. 3) bei verschiedenen Ligand L zu Basenpaarkonzentrationen $B(c_{DNA} \sim 7 \cdot 10^{-6}$ Mol Basenpaare/l) für DNA's unterschiedlicher Basenzusammensetzung $\blacktriangle$ Clostridium perfringens (73,5%AT) $\diamond$ Bacillus subtilis (56%AT) $\square$ Micrococcus luteus (28%AT)



Abbildung 19:

Relative Fluoreszenz (I_{rel}) im Emissionsmaximum von 287/170 (Nr. 51) bei verschiedenen Ligand L zu Basenpaarkonzentrationen B ($c_{DNA} \sim 7 \cdot 10^{-6}$ Mol Basenpaare/l) für DNA's unterschiedlicher Basenzusammensetzung

$\blacktriangle$ *Clostridium perfringens* (73.5%AT) $\diamond$ *Bacillus subtilis* (56%AT) $\square$ *Micrococcus luteus* (28%AT)



Abbildung 20: Relative Fluoreszenz (I_{rel}) im Emissionsmaximum von 288/92 (Nr. 40) bei verschiedenen Ligand L zu Basenpaarkonzentrationen B ($c_{DNA} \sim 7 \cdot 10^{-6}$ Mol Basenpaare/l) für DNA's unterschiedlicher Basenzusammensetzung
 $\triangle$ Clostridium perfringens (73,5%AT) $\blacklozenge$ Bacillus subtilis (56%AT) $\blacksquare$ Micrococcus luteus (28%AT)

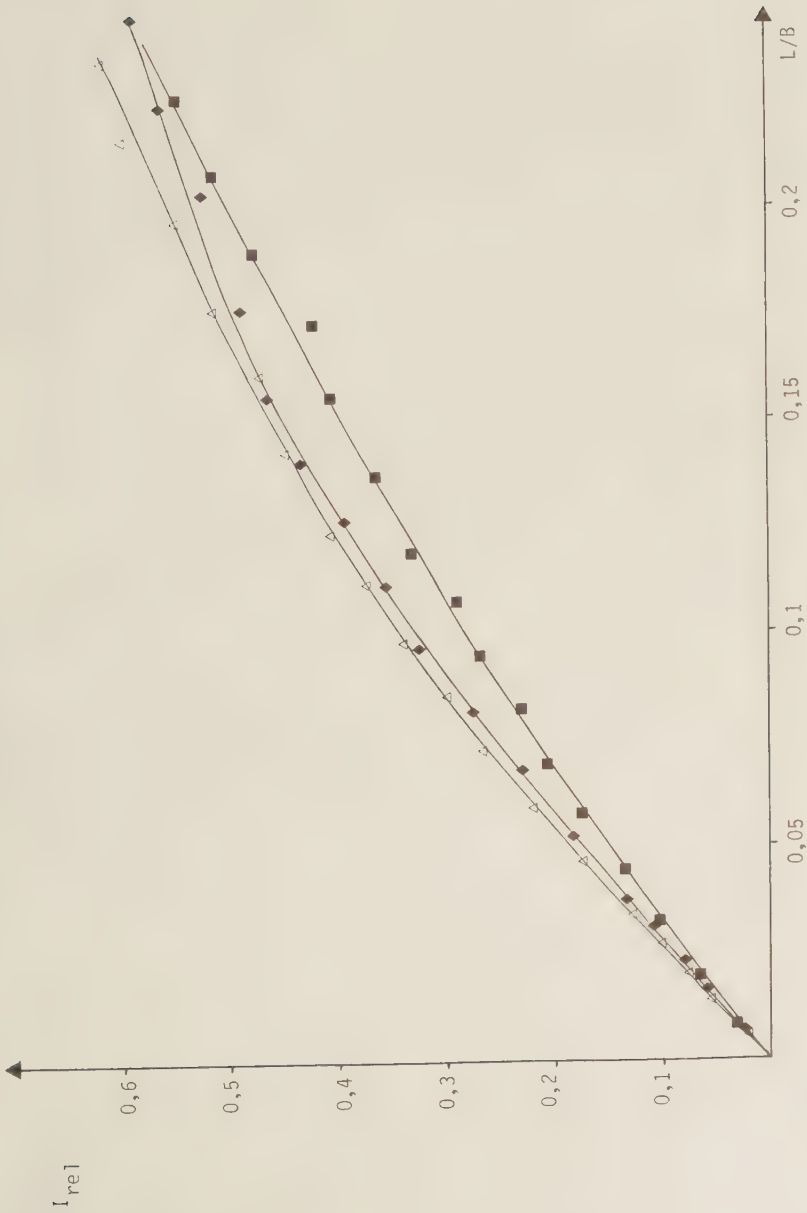
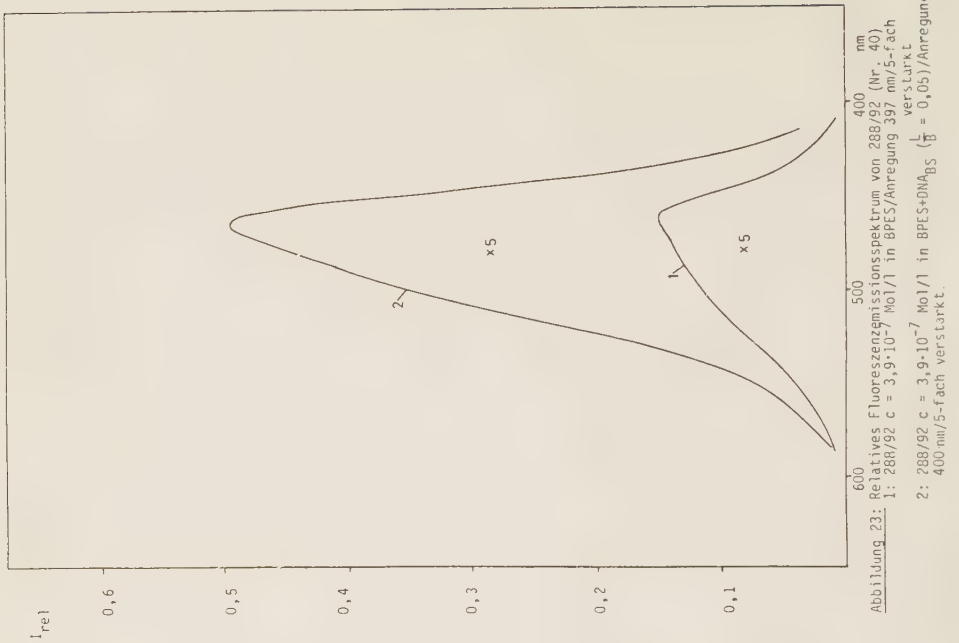
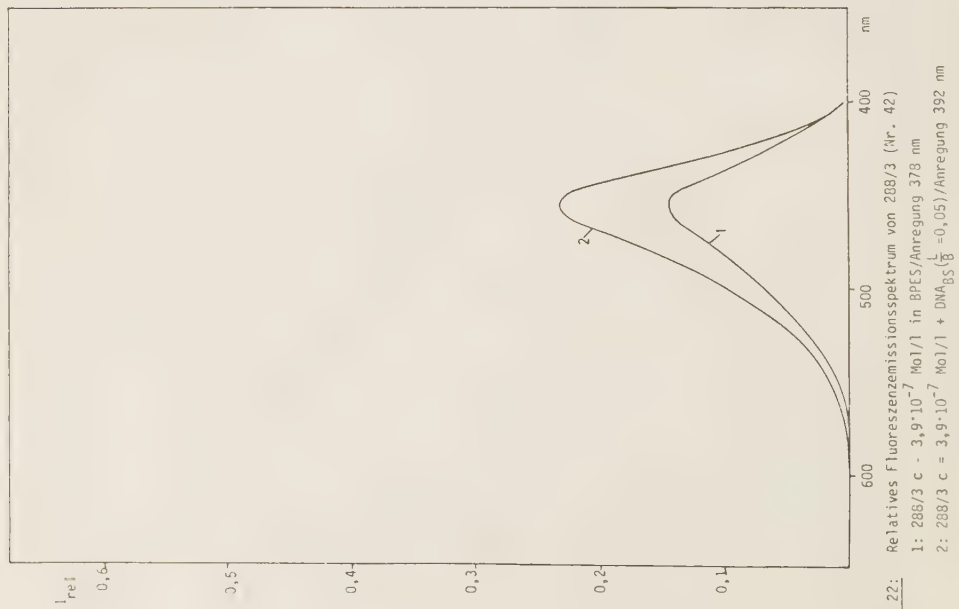


Abbildung: 21

Relative Fluoreszenz (I_{rel}) im Emissionsmaximum von 288/3 (Nr. 42) bei verschiedenen Ligand L zu Basenpaar-
konzentrationen B ($c_{DNA} \sim 7 \cdot 10^{-6}$ Mol Basenpaare/l) für DNA's, unterschiedlicher Basenzusammensetzung
△ *Clostridium perfringens* (73.5%AT) ◆ *Pacillus subtilis* (56%AT) ■ *Micrococcus luteus* (25%AT)



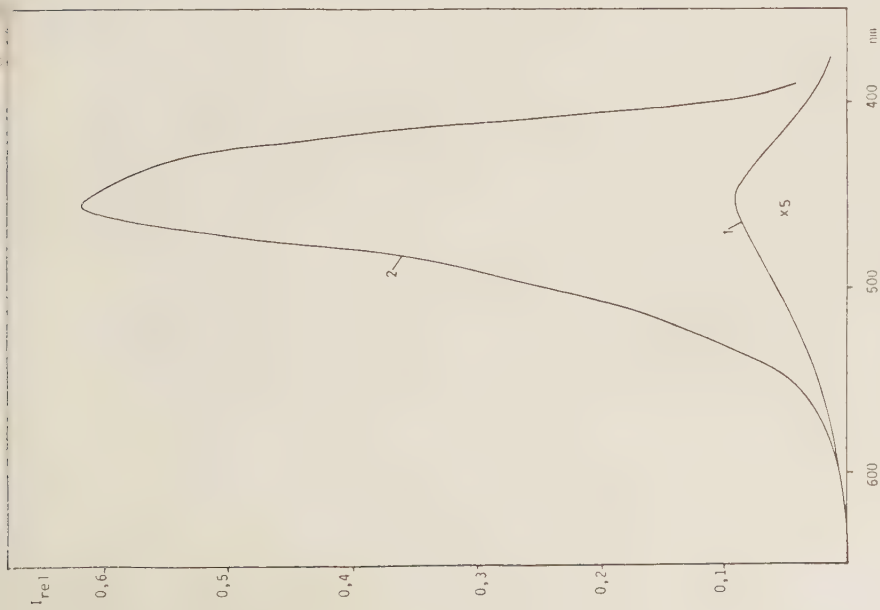


Abbildung 24: Relatives Fluoreszenzemissionsspektrum von 102/193 (Nr. 3)
 1: 102/198 c = $3,9 \cdot 10^{-7}$ mol/l in BPE5/Anregung 369 nm/5-fach verstärkt
 2: 102/198 c = $3,9 \cdot 10^{-7}$ mol/l + DMSO ($\frac{1}{5}$ 0,05)/Anregung 369 nm

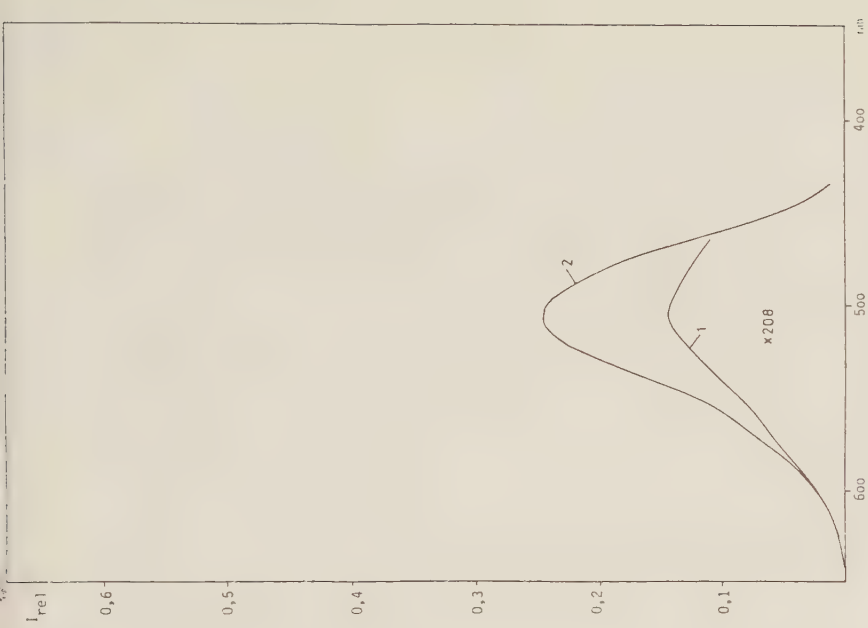


Abbildung 25: Relatives Fluoreszenzemissionsspektrum von 287/170 (Nr. 51)
 1: 287/170 c = $8,11 \cdot 10^{-6}$ mol/l in BPE5/Anregung 390 nm/10-fach verstärkt
 2: 287/170 c = $3,9 \cdot 10^{-7}$ mol/l in BPE5 + DMSO ($\frac{1}{5}$ 0,05)/Anregung 390 nm

3.3.2. Photostabilität

Da bei Fluoreszenzmessungen eine Bestrahlung erfolgt, die oft erhebliche Ausmaße annehmen muß, ist eine zusätzliche Voraussetzung für die Eignung einer Verbindung als Fluorochrom eine gute Lichtstabilität.

Diese wurde untersucht, indem die Lösung der entsprechenden Substanz in BPES einer Bestrahlung mit einer Quecksilbertauchlampe ausgesetzt, und die Abnahme der Konzentration UV-photometrisch bzw. fluorimetrisch bestimmt wurde. Parallel dazu wurde eine Lösung mit gleicher Konzentration an Ligand aber zusätzlich mit DNA, so daß eine Beladung von ungefähr 0,05 Mol Ligand pro Mol Basenpaar vorlag, bestrahlt und ebenfalls die Abnahme der Konzentration gemessen, wobei die Küvetten direkt an den äußeren Mantel der Lampe angelehnt wurden, um eine maximale Lichtausbeute zu erhalten. Da 253/152 (Nr. 36) eine wesentlich größere Instabilität aufwies, wurde ein Abstand der Küvette von 10 cm von der Lichtquelle gewählt.

Die Auswertung erfolgte durch Auftragung der Extinktionen bzw. relativen Fluoreszenzintensitäten, wobei die Anfangswerte gleich 100 % gesetzt wurden, gegen die Gesamtbestrahlungszeit und führte für die untersuchten Substanzen 102/198 (Nr. 3), 261/37, und 253/152 (Nr. 36) zu folgenden Ergebnissen:

Die UV-spektrometrisch bzw. fluorimetrisch bestimmten Zersetzungswerte stimmen vor allem bei längeren Bestrahlungszeiten recht gut überein, und in DNA-haltigen Lösungen sind die Liganden immer stabiler als in DNA-freien Lösungen, was auf eine Bindung der Substanzen an die DNA zurückgeführt werden muß.

Substanz	Methode	Zersetzung nach			
		30 min		60 min	
		mit DNA	ohne DNA	mit DNA	ohne DNA
102/198 (Nr. 3) Abstand: 0	UV	19 %	54 %	32 %	74 %
261/37 (Abb.26) Abstand: 0	F	22 %	84 %	41 %	97 %
	UV	19 %	66 %	31 %	90 %
253/152 (Nr.36) Abstand: 10 cm	F	29 %	66 %	37 %	76 %
	UV	40 %	75 %	43 %	78 %

Tabelle 2: Vergleich der Lichtstabilität der untersuchten Verbindungen

Insgesamt betrachtet ist 102/198 im Vergleich zu 261/37 etwas stabiler, und 253/152 stellt von diesen drei Verbindungen die instabilste dar, was sich bereits in einem Vorversuch herausstellte, wo gleiche Bestrahlungsabstände verwendet wurden. Diese Instabilität von 253/152 ist erklärbar durch das Vorhandensein der Vinylbrücke. So wurde bei dem ähnlich gebauten Stilbamidin eine cis-trans Umlagerung ¹⁰⁴⁾ und eine allgemein bekannte Dimerisierung zu Cyclobutanderivaten ¹⁰⁵⁾ gefunden.



18.18.96.

4. Diskussion

4.1. Bindungsstudien

4.1.1. Vergleich der Methoden

Vergleicht man die in Abschnitt 2.1.1. aufgeführten Methoden, so fällt auf, daß bei der UV- und Fluoreszenztitration bestimmte Voraussetzungen wie z. B. Auftreten eines isosbestischen Punktes oder Konstanz der Fluoreszenzintensität bei hoher Beladung erfüllt sein müssen und auch keine direkte thermodynamische Gleichgewichtseinstellung erfolgt, weshalb diese Methoden weniger geeignet erscheinen.

Auf Grund der starken Affinität der zu untersuchenden Verbindungen kommt die Gelchromatographie nicht in Betracht ⁴²⁾, da zu starke Adsorptionseffekte an das Gelmaterial auftreten; die Ultrazentrifugationsmethode ist ebenfalls nicht brauchbar, da mit ihr sicher nur relativ niedrige Affinitätswerte zu ermitteln wären, wobei die Problematik in der vollständigen Abtrennung der DNA aus dem Überstand liegt. Als geeignetste Methoden kommen daher die Gleichgewichtsdialyse nach W. Müller ⁵⁶⁾ und für stark bindende Liganden die von mir neu entwickelte Differentialverteilungsmethode in Betracht.

Stellt man die Werte, die mit der Dialysiermethode erhalten wurden, denen gegenüber, die durch Differentialverteilung ermittelt wurden, so kann man eine relativ gute Übereinstimmung beider Methoden feststellen, d. h. die Werte der Verteilungsmethode sind direkt mit denen der Dialysiermethode vergleichbar. Dabei spielt es keine Rolle, ob man Hexanol-(1) oder Oktanol-(1) als Oberphasenlösungsmittel verwendet, oder ob man den Liganden in Oberphase oder Unterphase löst. Durch die Anwendung der Differentialverteilungsmethode kann man einige Nachteile der Dialysiermethode ausgleichen. So fällt

durch den Verzicht auf Membranen das Problem der Membrangängigkeit der Liganden und der Adsorption der Liganden an die Membran und die damit vorhandene Beeinflussung der Gleichgewichtseinstellung weg. Weiterhin kann die schlechte Löslichkeit der Liganden in Puffer dadurch umgangen werden, daß man den Liganden in der Oberphase löst, wodurch die Anwendung von Suspensionen bei der Beladung der DNA vermieden werden kann ⁴²⁾.

Der Zeitaufwand zur Ermittlung einer Bindungskurve beträgt nur ca. 2 Tage, wodurch auch relativ instabile Verbindungen einer Messung zugänglich werden. Ein weiterer Vorteil- und vielleicht der wichtigste - liegt darin, daß auf Grund des Verteilungsverhaltens für den freien Anteil m ein um den Verteilungskoeffizienten K erhöhter Wert zur Messung gelangt. Damit sind noch relativ sichere Bestimmungen von m in einem Bereich möglich, wo die Dialysiermethode nicht mehr meßbare Konzentrationen liefert, auch unter Verwendung von Fluoreszenzmessungen zur Bestimmung des freien Anteils.

Voraussetzung für die Anwendung der Verteilungsmethode ist die Auffindung geeigneter Lösungsmittel für die Oberphase, die folgende Kriterien erfüllen sollten:

- a) der Verteilungskoeffizient sollte in einem günstigen Bereich im Vergleich zur Affinität liegen, d. h. größer als 1 und kleiner als 100 sein;
- b) in der Oberphase sollte sich genügend Substanz lösen;
- c) die Oberphase sollte möglichst wenig in Wasser oder Puffer löslich sein, um die Interaktion DNA-Ligand nicht zu beeinflussen;
- d) das Lösungsmittel darf selbstverständlich keine chemische Reaktion mit einem Partner eingehen, keine Emulsionen bilden, und keine UV-Absorption oder Fluoreszenz im zu messenden Bereich aufweisen;
- e) es darf keine DNA in die Oberphase gelangen, und die Dichte muß natürlich kleiner als 1 sein.

Für die entsprechenden Diimidazolin- und Diamidinverbindungen waren die Lösungsmittel der Wahl Oktanol-(1) und Hexanol-(1), da sie vor allem die Eigenschaften einer genügenden Lösungs-fähigkeit und eines genügend großen Verteilungskoeffizienten für Verbindungen aufweisen, die der Dialysiermethode nicht mehr zugänglich sind. Die Punkte d) und e) sind ebenfalls erfüllt, und Punkt c) ist aus der Aufstellung der Literaturwerte zu ersehen:

Löslichkeit von Oktanol-(1) in Wasser: $0,059\%^{106}$, $0,071\%^{107}$,
 $0,049\%^{108}$

Löslichkeit von Hexanol-(1) in Wasser: $0,62\%^{106}$, $0,60\%^{108}$

4.1.2. Bindungsparameter in Abhängigkeit von der chemischen Struktur

4.1.2.1. Affinitäten

Allgemein kann man sagen, daß eine biskationische Struktur größere Affinität zu DNA aufweist als eine monokationische oder ungeladene Verbindung (Nr. 1, 3, 14, 16). Eine Substitution in 3-Stellung des Indols mit einer Aminogruppe bringt kaum eine Veränderung (Nr. 14, 19, 38, 39), wenn, dann in Richtung niedrigerer Affinitäten, ebenso wenig wie der Übergang von einer Amidin- zu einer Imidazolinverbindung (Nr. 3, 4, 35, 36). Der Ersatz einer Amidinogruppe durch ein Amidinohydrazon oder Amidinophenylhydrazon bringt etwas höhere Affinitäten als die entsprechenden Vergleichsverbindungen (Nr. 23, 20). Der Austausch des Indolrings gegen ein Benzimidazol führt stets zu einer Abnahme der Affinität, wie Nr. 25, 29 und 31 im Vergleich zu Nr. 3, 48 und 50 zeigen.

Bei vinylverbrückten Heterozyklen wurde eine deutliche Abhängigkeit der Affinität von der Art des Heteroatoms gefunden: Bisbenzofurane (Nr. 32, 33) binden schwach, der Ersatz eines Benzofurans gegen ein Benzimidazol (Nr. 34) steigert

die Affinität, um beim Benzofuran-Indolderivat noch weiter erhöht zu sein. Ein Maximum wird in der Reihe durch zwei vinylverbrückte Indole (Nr. 38) erreicht. Ist ein Indol in 2-Stellung an einen Rest geknüpft, so resultiert immer eine höhere Affinität als durch Anknüpfung in 6-Stellung (Nr. 40-44, 47, 49).

Geht man von einem 6-Imidazolinyllindol als Grundstruktur aus, und betrachtet seine Substitution in 2-Stellung mit weiteren ungesättigten Kohlenwasserstoffresten oder Indolheterozyklen, so fällt eine gewisse Regelmäßigkeit auf. Eine Phenylenerweiterung von Nr. 15 zu Nr. 4 oder von Nr. 47 zu Nr. 50 bringt eine Affinitätszunahme um den Faktor 15-20, während eine Indol-erweiterung Nr. 15 nach Nr. 47 und nach Nr. 51 die Affinität um das 25-50-fache erhöht. Ein Vinylrest bringt einen Wert von etwa 1,5. Die Verknüpfung der Indole spielt ebenfalls eine Rolle, was daran zu erkennen ist, daß in 2-Stellung verknüpfte Indole (Nr. 38, 49) höhere Affinitäten zeigen als in 6-Stellung verknüpfte (Nr. 40, 47). Hieraus kann man folgern, daß nicht nur der Abstand der kationischen Zentren und die Anzahl der zu Wasserstoffbrückenbindungen befähigten Indole für die Affinität von Wichtigkeit ist, sondern auch die Art ihrer Verknüpfung. Insgesamt läßt sich bei obiger Reihe eine Zunahme der Affinität mit zunehmender Molekülgröße feststellen unter Berücksichtigung ähnlicher Strukturmerkmale, d. h. es gibt keinen optimalen Abstand der kationischen Flanken für eine möglichst effektive Bindung an DNA, wie sich vielleicht aus dem regelmäßigen Abstand der Basen und Phosphatreste in der DNA vermuten ließe. Vielmehr scheinen neben den elektrostatischen- und Wasserstoffbrückenbindungen zusätzlich hydrophobe Wechselwirkungen von Bedeutung zu sein, wie ein Übergang von Nr. 15 zu Nr. 4 oder von Nr. 47 nach Nr. 50 zeigt.

4.1.2.2. Spezifitäten

Als allgemeines Charakteristikum einer Adenin-Thymin spezifischen Verbindung wurde von W. M ü l l e r gefunden, daß sie einen linear angeordneten Anteil basischer Zentren mit einem gewissen Abstand besitzen muß ⁹⁸⁾. Weiterhin spielt bei heterozyklischen Verbindungen die Art des Heterozyklus eine Rolle, dergestalt, daß Benzofuran- und Benzothiophenheterozyklen relativ unspezifisch binden ⁴²⁾, im Gegensatz zu Indolen, da diese zusätzlich über Wasserstoffbrückenbindungen von der 1-Stellung aus in der Lage sind, mit dem N-3 des Adenin oder einer Carbonylfunktion des Thymin in Beziehung zu treten, was zu einer Spezifität führen kann. Guanin und Cytosin können keine Wasserstoffbrücken mit Liganden eingehen, da dazu befähigte Gruppen bereits innerhalb der Helixstruktur der DNA solche ausbilden.

Die gleiche Möglichkeit der Wasserstoffbrückenbindung besteht natürlich auch für Benzimidazole, wodurch sich deren AT-Spezifität erklären läßt. Auffallend ist, daß fast nur Verbindungen mit 2 kationischen Enden und einem Indol- oder Benzimidazolring nebst Substitution in 2-Stellung mit einem Benzolring oder ähnlichen Strukturen als besonders AT-spezifisch erkannt werden, wobei die Affinitäten dieser Verbindungen im Bereich von $2 \cdot 100 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}$ liegen. Die Verknüpfung eines Indols mit einem zweiten Heterozyklus vermindert die Spezifität, um bei einer weiteren Molekülvergrößerung noch mehr abzunehmen, offenbar weil mit einer Zunahme der Moleküldimension die Affinität beträchtlich ansteigt, was dann zwangsläufig dazu führt, daß die Verbindungen ein so großes Bestreben besitzen, sich an DNA anzulagern, daß kaum mehr ein Unterschied zwischen AT-reicher und AT-armen DNA gemacht wird.

4.1.3. Affinität in Abhängigkeit vom Verteilungskoeffizienten

Es fiel mir auf, daß Verbindungen mit kleinen Verteilungskoeffizienten zwischen Oktanol-(1) und BPES bei vergleichbarer biskationischer Struktur relativ kleine Affinitäten zu DNA aufweisen. Bei größeren Molekülen beobachtete man einen drastischen Anstieg des Verteilungskoeffizienten, der mit einer ebenso starken Zunahme der Affinität zu *Bacillus subtilis*-DNA einhergeht. Trägt man nun den natürlichen Logarithmus der Affinitätsparameter $\sigma_{an DNA_{BS}}$ gegen den natürlichen Logarithmus des Verteilungskoeffizienten K zwischen Oktanol-(1) und BPES graphisch auf, so erhält man eine Gerade, d. h. es besteht eine direkte Korrelation zwischen diesen beiden Werten, wobei die Verteilungskoeffizienten einen Bereich von 0,01-81 und die Affinitäten von $2,6-3400 \cdot 10^4 M^{-1}$ umspannen. Die niedrigen Affinitätswerte wurden hierbei durch die Dialysiermethode und die höheren durch die Differentialverteilungsmethode ermittelt. Die in Abb. 27 berücksichtigten Verbindungen sind nach dem Gesichtspunkt ausgewählt, daß nur ein- oder mehrkernige Indolverbindungen mit 2,6- oder 2,2-Verknüpfung herangezogen wurden.

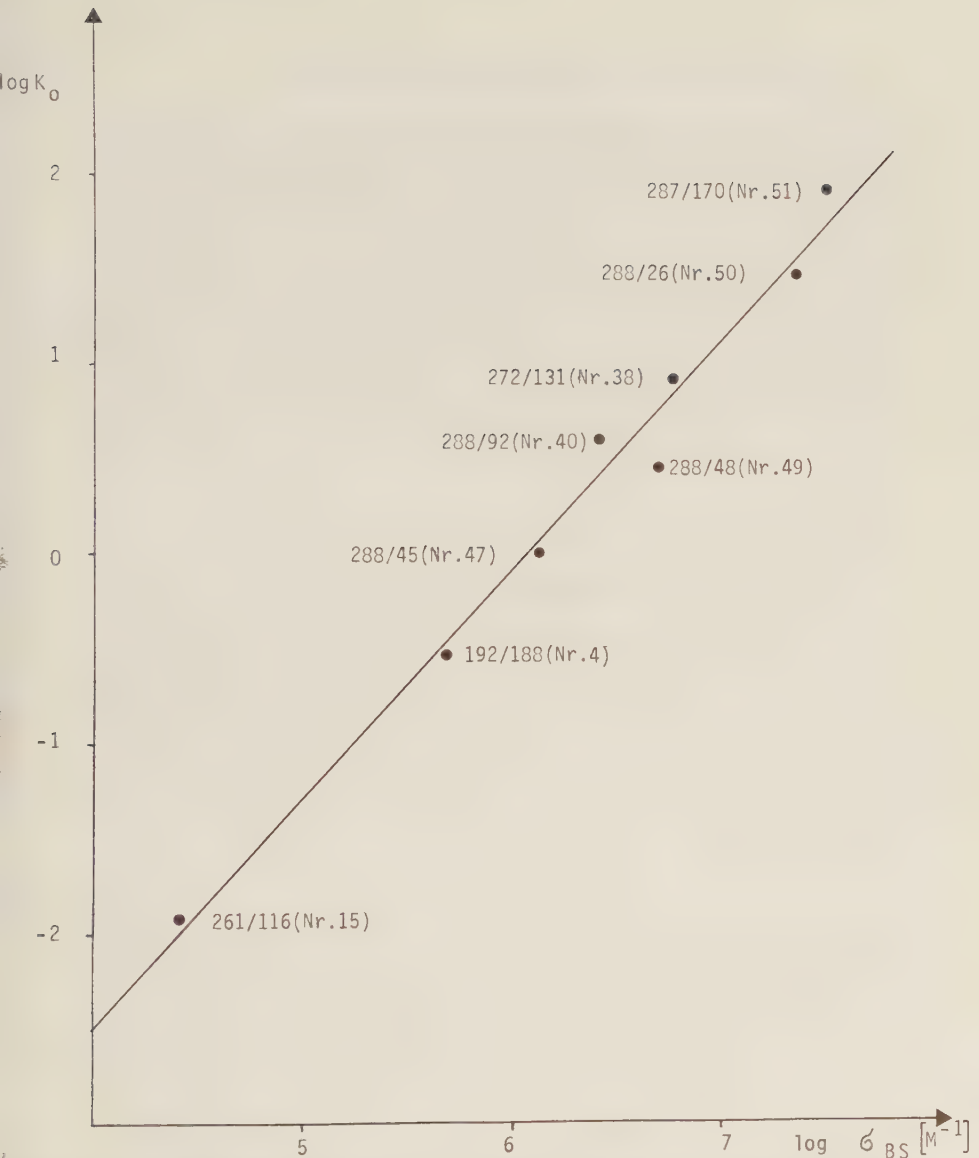


Abbildung: 27 Abhängigkeit der Affinität für DNA_{BS} (ϵ_{BS}) verschiedener strukturell vergleichbarer Substanzen von ihrem Verteilungskoeffizienten (K_O) zwischen Oktanol-(1) und BPES.

4.2. DNA-Bindung und biologische Aktivität

Biskationische Verbindungen zeigen eine ausgeprägte biologische Wirksamkeit, die sich über antibakteriellen und fungistatischen ¹⁰⁹⁾ bis zu trypanoziden und antileukämischen Aktivitäten ^{37,40)} erstreckt. Nachdem ein Zusammenhang zwischen der antibakteriellen Wirksamkeit und dem DNA-Bindungsverhalten erkannt worden war ⁴²⁾ und auch die Hemmung einer Reverse-Transcriptase ¹¹⁰⁾ eine gewisse Abhängigkeit von der Bindung zeigt ⁴²⁾, ist natürlich von Interesse, ob die antileukämischen und trypanoziden Wirksamkeiten auch im Zusammenhang mit der DNA-Bindung gesehen werden können.

4.2.1. Antileukämische Wirksamkeit

4.2.1.1. In vitro Untersuchungen

In vitro besteht die Möglichkeit, eine potentielle antileukämische Aktivität einer Substanz durch Hemmung einer DNA-Polymerase aus Leukämieviren zu untersuchen, was C. D a v e ²⁹⁾ bei Bisguanylhydrazonen durchführte, mit dem Ergebnis, daß eine Abhängigkeit besteht zwischen der Hemmung der DNA-Polymerase und der biologischen Aktivität einerseits, und der DNA-Affinität andererseits.

Ebenfalls geeignet zur Prüfung auf antileukämische Aktivität ist ein von E. D e C l e r c q ¹¹¹⁾ verwendetes Modell, mit dem die Wachstumshemmung verschiedener von O. D a n n und Mitarbeitern synthetisierter, biskationischer Verbindungen von Mäuse L 1210 Leukämiezellen in vitro untersucht wurde.

Vergleicht man die Dosierungen, die zu einer Einschränkung des Wachstums der Leukämiezellen in vitro auf die Hälfte führen, mit den erhaltenen DNA-Bindungsdaten, so kommt man zu folgendem Ergebnis: Zwischen Amidin- und Imidazolinverbindun-

gen findet man nur geringe Wirksamkeitsunterschiede (Nr. 3, 4, 32, 33), was im Einklang mit den DNA-Affinitäten steht, wo ebenfalls nur geringe Unterschiede feststellbar sind. Im Gegensatz dazu steht, daß ein isosterer Austausch eines Sauerstoffatoms gegen ein Stickstoffatom im heterozyklischen System eine deutliche Zunahme der DNA-Affinität bewirkt, wohingegen keine Änderung der Wachstumshemmung gegeben ist (Nr. 33, 35). Eine direkte Abhängigkeit der Wachstumshemmung von der DNA-Spezifität liegt nicht vor, da sowohl relativ spezifisch als auch relativ unspezifisch bindende Substanzen (Nr. 14, 18, 12, 42) ähnliche Hemmwerte aufweisen können.

Insgesamt ergibt sich jedoch in Bezug auf die DNA-Affinität folgendes Bild: Relativ kleine, hydrophile Verbindungen, die auch eine niedrige DNA-Affinität besitzen, zeigen geringe Hemmwirkung (Nr. 14, 18, 5), eine Vergrößerung der Moleküle führt in einen sehr wirksamen Bereich mit Molekülen mittlerer Affinität, während aus einer weiteren Steigerung der DNA-Affinität wiederum unwirksamere Moleküle resultieren (Nr. 40, 47, 49).

Nr.	ID ₅₀ (µg/ml) L1210 Wachstum	Affinitätsparameter $\phi_{BS} \cdot 10^4 M^{-1}$
14	60,5	6
18	71,3	1,65
5	>100	14,0
3	4,15	77
		52
4	2,82	48
33	1,51	~3,9
32	0,497	7,0
35	1,51	94
12	1,30	~ 70
42	1,28	135
47	13,3	145
40	24	260
49	>100	500

Tabelle 3: Beziehungen zwischen der Wachstumshemmung von L1210 Zellen in vitro und der Affinität zu DNA_{BS} der untersuchten Verbindungen. ID₅₀ = Konzentration bei der 50%ige Wachstumshemmung eintritt.

4.2.1.2. In vivo Untersuchungen vom NCI ¹¹²⁾

Als Wirkungsmechanismus einer antileukämisch aktiven Verbindung kommt eine Interaktion mit den DNA's und eine damit verbundene Störung von Syntheseleistungen der Zelle in Betracht⁴⁾. In Tab. 4 wurden die Affinitätsparameter für *Bacillus subtilis*-DNA einer Reihe von Verbindungen der antileukämischen Wirksamkeit in vivo bei verschiedenen Dosierungen gegenübergestellt. Die NCI-Untersuchungen wurden bei der Mäuseleukämie P 388 durchgeführt, indem 3-mal alle 4 Tage die Verbindungen i.p. injiziert wurden. Eine Wirksamkeit wird ab einem T/C-Wert (T = Lebensdauer im Test, C = Lebensdauer der Kontrolle) von 125 angenommen ¹¹²⁾. Ein T/C-Wert von 200 bedeutet danach eine Verdoppelung der Lebensdauer ¹¹²⁾.

Aus Tab. 4 geht hervor, daß relativ kleine Diamidine (Nr. 3, 14, 25), die sich durch trypanozide Aktivität und hohe Spezifität für AT-Paare auszeichnen, keinerlei antileukämische Aktivität aufweisen. Bei vinylverbrückten Verbindungen mit zwei Benzofuranheterozyklen (Nr. 32, 33) bringt der Ersatz eines Sauerstoffatoms durch ein Stickstoffatom Verbindungen (Nr. 35, 36) mit höherer Affinität zu DNA, ohne aber die Wirksamkeit zu verbessern, d. h. eine Abhängigkeit von den gefundenen DNA-Affinitäten ist nicht gegeben. Erst bei Substanzen mit sehr großen Affinitäten (Nr. 38, 49, 50) tritt eine deutliche Erhöhung der Wirksamkeit zutage, wobei eine 2,6'-Verknüpfung (Nr. 40, 47) im Vergleich zu einer 2,2'-Verknüpfung der Indole (Nr. 38, 49) mit einer Abnahme der Aktivität einhergeht, was in diesem Ausmaß bei der DNA-Bindung nicht festgestellt werden konnte.

Insgesamt läßt sich sagen, daß das DNA-Prokaryonten-Bindungsmodell zwar Anhaltspunkte für eine mögliche Wirksamkeit liefert, jedoch in vivo noch weitere Parameter zu berücksichtigen sind. So wurde bei der Testung antileukämisch aktiver Phthalanilide festgestellt, daß eine bestimmte Molekülgröße vorhanden

Nr.	Wirksamkeit T/C bei P 388				
	400mg/kg	100mg/kg	50mg/kg	12,5mg/kg	$\sigma_{BS} \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}$
33			158	138	$\sim 3,9$
14				100	6,0
32		101-140	152		7,0
25			103	103	17,5
4		189	154-171	148	48
12				122	~ 70
3		93-121	96-106	100	77
35		88-181	143-149	139	94
36		185	160		98
42				111-135	135
47		100-159	116		145
40		101	99-110	105	260
49	159	210			500
38	271	162			600
50	191	200			~ 2300
51				125	~ 3400

Tabelle 4: Beziehungen zwischen der Wirksamkeit (T/C-Wert) der untersuchten Verbindungen bei verschiedenen Dosierungen in vivo und ihrer Affinität zu *Bacillus subtilis*-DNA

sein muß ³⁷⁾, und daß Imidazolinverbindungen wirksamer als die entsprechenden Amidinverbindungen ³⁷⁾ sind (vgl. Nr. 3, 4). Mit dem Übergang von der Amidin- zur Imidazolin-Gruppierung ändert sich natürlich die Lipophilie des Moleküls ¹¹³⁾. Die Bedeutung dieser Größe wurde bereits frühzeitig von B. F. Cain ¹¹³⁾ erkannt, der den Einfluß der Lipophilie auf die Wirksamkeit bis-quarternärer Stickstoffverbindungen untersuchte und quantitative Struktur-Wirkungsbeziehungen unter Einbeziehung des Verteilungsverhaltens formulierte ³⁵⁾.

Für eine biologische Aktivität können neben obigen Parametern natürlich auch die erreichbaren Blutspiegel von Bedeutung sein, die von W. Gluth ¹¹⁴⁾ für einige Verbindungen bestimmt wurden, wobei sich jedoch keine direkte Korrelation zwischen der Höhe der Blutspiegel und der antileukämischen Wirksamkeit herausstellte ¹¹⁴⁾.

Eine gute antileukämische Wirksamkeit dürften damit Verbindungen mit folgenden Eigenschaften besitzen: Sie sollten große bis sehr große Affinität zu DNA aufweisen, ihre Molekülgröße und damit ihre Lipophilie sollte ein gewisses Maß überschreiten und sie sollten sich durch relativ niedrige Blutspiegel auszeichnen, d. h. möglichst schwerlöslich sein, um die akute Toxizität zu verringern, wie sie bei der löslichen Verbindung Nr. 51 auftritt ¹¹²⁾.

4.2.2. DNA-Bindung und trypanozide Aktivität

Als Hauptangriffspunkt einer trypanoziden Verbindung kommt die in Trypanosomen vorhandene Kinetoplasten-DNA (k-DNA) in Frage ⁴³⁾. Diese DNA unterscheidet sich von normaler zellulärer DNA dadurch, daß sie aus einem größeren Anteil von AT-Basenpaaren besteht ⁴³⁾, die DNA größtenteils in zirkularer Form vorliegt ¹⁴⁾ und keine Histonhülle vorhanden ist ¹¹⁵⁾. Auf Grund dieser Unterschiede ist ein selektiver Angriff auf die k-DNA denkbar, ohne daß der Wirtsorganismus zu sehr geschädigt wird. Für eine

solche Selektivität sind, wie schon gezeigt werden konnte ⁴²⁾, Verbindungen mit großer Spezifität zu AT-Paaren prädestiniert, da zu erwarten ist, daß diese bevorzugt mit der k-DNA Komplexe ausbilden. Eine Abhängigkeit der Wirksamkeit von der DNA-Spezifität, wobei als Modell bakterielle DNA von *Micrococcus luteus* und *Bacillus subtilis* diente, geht aus Tab. 5 hervor.

Man kann erkennen, daß Verbindungen mit ausgeprägter AT-Spezifität auch eine sehr gute Wirksamkeit besitzen, was als Angriffspunkt dieser Substanzen die k-DNA vermuten läßt. Nimmt die Spezifität ab, so geht die Wirksamkeit auch deutlich zurück. Auffallend ist, daß die Imidazolinderivate in ihrer Wirksamkeit gegenüber Trypanosomen den Amidinderivaten all-gemein unterlegen sind, obwohl sich bei der Bindungsspezifität an DNA keine Unterschiede feststellen lassen. Grundsätzliche Unterschiede zwischen Am- und Im-Verbindungen zeigen sich jedoch bei der Hemmung trypsinähnlicher Proteinase, bei welchen Im-Verbindungen wirkungslos sind ⁴⁴⁾.

Nr.	T.cong. DCM ^{b)} in mg/kg	ref.	T.vivax DCM in mg/kg	ref.	Spezifitäts- parameter
3	3-10	116	3	117	0,09
14	>10 ^{c)}	117	0,15	116	0,10
19	-	-	0,25	116	0,10
2	3	119	<10	117	0,10
5	8-10	119	-	-	0,12
12	14 ^{d)}	116	-	-	0,13
21	>30	119	10	119	0,14
23	>30	119	>10	119	0,19
20	-	-	>30	119	0,19
49 ^{a)}	30	116	>10 <50	117	0,24
9	30	117	30	117	0,25
32 ^{a)}	>100	118	-	-	0,33
33	>100	116	-	-	0,37
38 ^{a)}	<30	117	-	-	0,42
51 ^{a)}	10	119	30	119	~0,65
17 ^{a)}	-	-	≥10	119	~0,65
Ausnahmen: 15 ^{a)}	>30	117	>50	117	0,12
4 ^{a)}	>30	118	-	-	0,12
6 ^{a)}	-	-	>5 <25	117	0,10

Tabelle 5: Wirksamkeit der untersuchten Substanzen gegen T.congolense und T.vivax in der Maus in Abhängigkeit von der AT-Spezifität

a) Im als Endgruppe

b) DCM = Dosis curativa minima in mg/kg Körpergewicht
- = nicht getestet

c) Mittlere effektive Dosis in mg/kg Körpergewicht

d) Rezidivdosis

4.3. Bindungsart biskationischer Verbindungen

Untersuchungen zur Bindungsart biskationischer Verbindungen wurden hauptsächlich, neben einer Berücksichtigung der Veränderung spektroskopischer Parameter ⁶⁰⁾, durch ihren Einfluß auf kovalent-geschlossene, superhelikale Plasmid-DNA ¹⁸⁾ und die Viskositätsänderung bei kurzer, stäbchenförmiger DNA ¹²⁰⁾ durchgeführt.

So bestimmte A. W. B r a i t h w a i t e ¹²¹⁾ in einem Durchflußviskosimeter die Viskositätsänderung von PM 2 Bakteriophagen-DNA bei Anwesenheit von NSC 101327, einer quartären Stickstoffverbindung, und von Diacetyldiphenylharnstoff-bis-(guanylhydrazon) (DDUG) bei verschiedenen Konzentrationen. Nachdem die beiden Substanzen nur eine geringfügige monotone Zunahme der Viskosität zeigten, konnte eine Interkalation ausgeschlossen werden ¹²¹⁾. Bei Methylglyoxalbisguanylhydrazon konnten ebenfalls keine Anhaltspunkte für eine Interkalation gefunden werden ¹⁸⁾.

Für das biskationische Diamidin Berenil^R wurde von B. A. N e w t o n ⁷³⁾ festgestellt, daß es die Viskosität DNA-haltiger Lösungen nicht ansteigen läßt, was charakteristisch für eine Interkalation wäre, und weiterhin fand M. J. W a r i n g ¹⁾ bei der Untersuchung kovalent-geschlossener PM 2 DNA, daß der Sedimentationskoeffizient der kovalent-geschlossenen, superhelikalen Form bei Anwesenheit verschiedener Konzentrationen von Berenil^R kaum verändert wird, d. h. die Verbindung nicht interkaliert. B. F e s t y ¹²⁰⁾ konnte für das trypanozide 2-Hydroxystilbamidin mittels Viskositätsmessungen an PM 2 DNA und stäbchenförmiger DNA eindeutig eine Interkalation ausschließen, obwohl eine bathochrome Verschiebung des UV-Maximums bei Anwesenheit von DNA und eine starke Erhöhung der Fluoreszenz bei einer Bindung an dieser auf Grund der gleichen Befunde bei Ethidium für eine Interkalation hätte sprechen können ¹²⁰⁾. Als Modell wird vorgeschlagen, daß sich

2-Hydroxystilbamidin wegen des Abstandes der Amidgruppen von 13Å in die kleine Helixrille einlagern könnte, da einige Abstände von Phosphatgruppen der DNA diesen Wert besitzen, was günstig für eine Interaktion erscheint ¹²⁰⁾.

Für DAPI hat P. C h a n d r a ⁵⁹⁾ mittels UV-Spektroskopie Bindungsparameter ermittelt und mittels Mikrokalorimetrie und Affinitätschromatographie das Bindungsverhalten studiert. Er kommt zu dem Ergebnis, daß sich drei verschiedene Bindungskonstanten ermitteln lassen, und daß DAPI im Bereich $r = 0,05-0,15$ interkalieren könnte, wenn man von der Behauptung von F. Q u a d r i f o g l i o ¹²²⁾ ausgeht, daß die Bindungsenthalpie bei der Wechselwirkung DNA/Ligand bei der Interkalation einen Wert von -5 bis -7 kcal/Mol annimmt.

J. K a p u ś c i ń s k i ⁶⁰⁾ untersuchte die Einflüsse von Viskosität, Ionenstärke, Zusatz von Saccharose, und Zusatz von Natriumdodecylsulfat auf die UV-spektroskopischen- und Fluoreszenzeigenschaften von DNA/DAPI Komplexen und kommt zu dem Schluß, daß es interkalieren soll. Gegen diese Befunde sprechen Untersuchungen von E. S t e p h i e n ^{57,58)}, die sich mit dem Einfluß von DAPI auf die Spaltung von Col E 1 DNA mittels des Restriktionsenzym ECo R I beschäftigte, und fand, daß bei einer Beladung $r=0,05$ die Spaltung stimuliert wird, dann abnimmt, und bei einem Wert $r = 0,5$ das Enzym vollständig gehemmt wird. Um nun einen Einblick in die Art der Bindung von DAPI an Col E 1 DNA zu erhalten, führte sie eine Gelelektrophorese in Anwesenheit verschiedener Konzentrationen von DAPI (0-1,4 µg/ml) durch, wo sich keine Unterschiede in den Mobilitäten der superhelikalen DNA feststellen ließen, und damit eine Interkalation ausgeschlossen werden konnte, was mit Ergebnissen von W. M ü l l e r ¹⁰²⁾ im Einklang steht, und auch von A. B i e r z i ń s k i ¹²³⁾ auf Grund der Ähnlichkeit von DAPI und 2-Hydroxystilbamidin gefordert wird.

Einen indirekten Beweis, daß DAPI in der großen Rinne der DNA gebunden wird, liefern Ergebnisse von M. S. L i n ¹²⁴⁾. Er untersuchte das Fluoreszenzverhalten von DAPI-DNA Komplexen und fand eine deutliche Löschung, wenn in die DNA das Thymin-Analoge 5-Bromdesoxyuridin eingebaut wird. Da auf Grund der Lokalisation des Bromatoms in der großen Rinne auch die Fluoreszenz von H 33258 gelöscht wird, das sich hier einlagern kann ¹²⁵⁾, könnte der gleiche Effekt bei DAPI auf eine ähnliche Bindungsart hindeuten. Mit einer Außenanlagerung läßt sich auch der Befund in Einklang bringen, daß DAPI keine Mutationen im Ames Salmonella/Microsomen Platten-Test hervorruft ^{58,126)}. Die Mutagenität vieler Liganden wird nämlich auf ihre Interkalation zurückgeführt ^{2,127)}.

Meine gelelektrophoretischen Untersuchungen der beiden Diamidine (Nr. 14, 19) und der vier Diimidazoline (Nr. 4, 6, 38, 39) ließen ebenfalls keine Anzeichen für eine Interkalation erkennen, obwohl bei den sechs Verbindungen unterschiedliche Abstände der positiven Ladungen, unterschiedliche DNA-Affinitäten, und auf Grund der Aminosubstitution andere Bänderungsmuster bei Chromosomenfärbungen gefunden wurden, die eine unterschiedliche Bindungsart nahelegten.

Die erhaltenen Ergebnisse über die Bindungsart stimmen mit vorstehenden literaturbekannten Fakten überein, so daß auf Grund bisheriger Versuche davon ausgegangen werden kann, daß biskationische Verbindungen bei der Bindung an DNA keine Interkalation aufweisen. Da die untersuchten Verbindungen mehr oder weniger AT-spezifisch an DNA binden, findet sich erneut die Aussage von W. M ü l l e r bestätigt, daß mit einer Außenanlagerung an DNA eine AT-Spezifität einhergeht ⁹⁸⁾.

4.4. Diagnostische Anwendbarkeit

Für die Fluoreszenzfärbung von Chromosomen werden neben Quinacrin ⁴⁹⁾ und Hoechst 33258 ⁴⁸⁾ auch DAPI (Nr. 3) ⁵⁵⁾ und

von ihm abgeleitete Verbindungen eingesetzt, wobei sich verschiedene Bänderungsmuster in Abhängigkeit vom pH-Wert, von der Zusammensetzung der DNA, und der Art des Fluorochroms ergeben. Hierbei kann eine Fluoreszenzänderung einmal durch eine unterschiedlich starke Bindung des Liganden an die DNA, d. h. durch eine Spezifität für die Basenpaare gegeben sein ^{42,98}), wie bei H 33258, oder andererseits durch eine unterschiedliche Fluoreszenzintensität des an AT- oder GC-Basenpaare gebundenen Liganden, wie bei Quinacrin ¹²⁸), wobei sicher auch eine Intensitätszunahme der Fluoreszenz bei der Bindung an DNA im Vergleich zum ungebundenen Liganden eine Rolle spielen kann.

Verbindungen, die eine starke Basenabhängigkeit der Fluoreszenz gepaart mit einer Fluoreszenzerhöhung im Vergleich zum ungebundenen Liganden zeigen (Nr. 3,51), eignen sich gut für Chromosomenfärbungen ^{55,129}), während Verbindungen, denen diese Eigenschaften fehlen (Nr. 40,42), nicht geeignet sind ¹⁰¹). Eine spezifische Bindung an AT-Basenpaare, wie bei Verbindung 288/3 (Nr. 42), genügt also nicht für eine gute Chromosomenfärbung. Bei diesem Vergleich nicht berücksichtigt sind Unterschiede zwischen isolierter DNA und DNA in Chromosomen, wobei letztere in einem hoch organisierten Zustand vorliegt und mit chromosomalen Proteinen besetzt ist, die ebenfalls Einfluß auf das Fluoreszenzmuster haben können ^{130, 131}).

B. Experimenteller Teil

1. Allgemeine Angaben

Alle erwähnten Chemikalien wurden in p. a. Qualität oder in der reinsten, erhältlichen Form verwendet. Als Wasser wurde stets zweifach in Glasapparaturen destilliertes Wasser eingesetzt. Die Reinigung von Glasgeräten und Dialysierzellen erfolgte zuerst in Extran^R-sauer Merck und nach dreimaligem Zwischenspülen mit Wasser in Extran^R-alkalisch. Anschließend wurde mindestens fünfmal mit Leitungswasser und dreimal mit destilliertem Wasser gespült.

Verwendete Geräte:

pH-Meter Typ 201 der Fa. Orion Research mit einer kombinierten Glaselektrode für pH-Messungen

Spektralphotometer DMR 21 der Fa. Zeiss, Oberkochen

Biostat Fermenter der Fa. Braun, Melsungen

Spectrofluorometer SFM-23 der Fa. Kontron, Eching

Digitales Spektralfluorometer PMQ 3 der Fa. Zeiss, Oberkochen

Dampfdruck-Osmometer der Dr. Ing. Herbert Knauer KG, Berlin

Laborschüttler HT der Fa. Braun, Melsungen und Vibrax-VXR der Fa. IKA

Zweikanalschreiber LKB 2210 der Fa. LKB, München

Kühlzentrifuge Hermle ZK-4 mit Rotor A.8.24 und A.6.14 mit Polypropylengefäßen der Fa. Vetter, St. Leon-Rot

Ultrazentrifuge TGA-65 mit Rotor Typ TFT 65.13 und 65.38 und Polyallomerröhrchen der Fa. Kontron, Eching

Ultraschallbad Sonorex der Fa. Bandelin

Labortauchlampe S 81 der Fa. Quarzlampengesellschaft Hanau

Meßpipetten 1 ml, 2 ml, 5 ml, der Fa. Brand

Pasteurpipetten 150 mm, WU Mainz

Pipetten der Fa. Eppendorf, Hamburg mit 5, 10, 20, 50, 100, 200 und 500 µl Festvolumen

Variable Pipetten der Fa. Gilson C 200, C 1000, C 5000

Pipettenspitzen gelb und blau der Fa. Sarstedt, sowie

C 5000 der Fa. Abimed, Düsseldorf
 Magnetrührer Combimag RCT der Firma IKA
 Kunststoffzentrifugenröhrchen aus Polystyrol (Art. Nr. 55.468) mit 13 ml Inhalt und Polyethylenstopfen (Art. Nr. 65.816) der Fa. Sarstedt, Nümbrecht
 Einmalspatel aus Polystyrol (Art. Nr. 81.970) der Fa. Sarstedt, Nümbrecht
 Original Hanau UV-Fluotest-Gerät mit 254 und 366 nm Anregung
 Mikrowellenherd Microtherm 660
 Photographische Aufnahmen: Linhof-Repro-Camera 9x12 mit Rotfilter, Transilluminator mit 254 nm, Polaroid Film Land 4x5 Typ 55 pos./neg. 50 ASA
 Pharmacia Gel Electrophorese Apparatur GE-2/4LS mit Glasröhrchen von 20 cm Länge und einem Innendurchmesser von 5 mm, der Fa. Pharmacia, Uppsala.

Verwendete Lösungen bzw. Puffer:

BPE	:	0,01 m Natriumphosphat (Na_2HPO_4 und NaH_2PO_4 nach dem jeweiligen pH-Wert), 0,001 m EDTA (pH=7,0)
BPES	:	BPE+0,18 m NaCl (pH=7,0)
CS	:	0,03 m Natriumcacodylat 0,05 m Cacodylsäure 0,18 m NaCl (pH=5,9)
SSC	:	0,015 m Natriumcitrat 0,15 m NaCl (pH=7,0)
EDTA-NaCl-Lösung	:	0,1 m EDTA 0,15 m NaCl (pH=8,2)
SDS	:	25 % w/w Natriumdodecylsulfat
Elektrophoresepuffer	:	0,05 m Tris 0,02 m Natriumacetat 0,002 m EDTA 0,018 m NaCl (pH=8,05 mit Eisessig)

Färbepuffer : Elektrophoresepuffer 1:100 verdünnt
 + 1mg/l Ethidiumbromid

Auftragpuffer 0,09 m Tris
 für Gelelektro- 0,09 m Borsäure
 phorese : 0,0025 m EDTA
 0,05 % Bromphenolblau (pH=8,3)

2. Gewinnung von DNA

2.1. Anzucht der Bakterien ¹⁰²⁾

Zusammensetzung des Kulturmediums:

Difco-Yeast-Extrakt	3,0 g
$K_2HPO_4 \times 3 H_2O$	1,0 g
$MgSO_4 \times 7 H_2O$	0,5 g
Spurensalz-Lösung	1,0 ml
H_2O	ad 1000,0 ml (pH=6,9)

Glucose 10 g/1000,0 ml Medium

Spurensalz-Lösung:

$ZnSO_4 \times 7 H_2O$	11,0 g
$MnSO_4 \times 1 H_2O$	6,0 g
$FeSO_4 \times 7 H_2O$	1,0 g
$CoSO_4 \times 7 H_2O$	0,3 g
$CuSO_4 \times 5 H_2O$	0,04 g
H_3BO_3	0,06 g
KJ	0,001 g
EDTA (II)	5,0 g
H_2O	ad 1000,0 ml

Vorkultur: Das Kulturmedium wird im Autoklaven sterilisiert und anschließend separat sterilisierte Glucoselösung (10%) zugesetzt, daß eine Endkonzentration von 10 g Glucose pro 1 l Nährmedium vorliegt. Die Vorkulturen werden in 1 l

Keimkolben durchgeführt, indem das Medium unter einem Laminar-flow mittels einer Platinöse beimpft und über Nacht bei 37 °C geschüttelt wird. Diese Vorkultur dient zur Beimpfung der Hauptkultur, indem sie dieser zugesetzt wird.

Hauptkultur: Das Nährmedium wurde im Fermentergefäß autoklaviert, sterilisierte Glucoselösung zugefügt und anschließend mit 500 ml Vorkultur beimpft.

Fermentationsbedingungen:	Anfangs-pH	: 6,9
	Nährmedium	: 8 l
	Rührgeschwindigkeit	: 400 U/min
	Temperatur	: 30 °C
	Belüftung	: 8 l/min
	pH-Regelung	: 10 % NaOH

Das Wachstum der Bakterien konnte durch den Verbrauch an Lauge zur Neutralisation der Kulturflüssigkeit oder durch Entnahme von Proben und der Bestimmung ihrer Trübung verfolgt werden. Am Ende der log-Phase, nach ca. 8 Stunden, wird die Fermentation abgebrochen, die Bakteriensuspension mit 3000 U/min zentrifugiert und die sedimentierten Bakterien eingefroren. Die Ausbeute beträgt ca. 70 g feuchte Bakterienmasse/8 l Ansatz.

2.2. Isolation von DNA

2.2.1. Bacillus subtilis-DNA ^{7,42,102,132)}

20-25 g Bakterienzellen werden in einem geeigneten Zentrifugenbecher in 400 ml SSC-Puffer suspendiert und anschließend bei 4000 UpM 5 Minuten bei 4 °C zentrifugiert. Nach dieser Waschprozedur wird die überstehende Lösung abgegossen und die Zellen erneut in 450 ml SSC-Puffer suspendiert. Dabei nimmt man jeweils kleine Mengen Puffer und schwemmt den festhaftenden Bakterienkuchen in möglichst feiner Verteilung auf. Die Suspension wird in eine 1 l Schraubverschlußflasche überführt und schnell auf 37 °C erwärmt. Dann gibt man eine Lösung von 250 mg Lysozym (Merck Nr. 5281), gelöst

in 5ml Puffer, hinzu und inkubiert in einem vorgeheizten Wasserbad bei 37 °C 5 Minuten unter gelegentlichem Umschütteln. Man stellt die Lösung mit 25%-iger SDS-Lösung auf 0,5 % Endkonzentration ein, erwärmt schnell auf 65 °C und hält die Lösung unter gelegentlichem Umschwenken 10 min. bei dieser Temperatur. Anschließend wird unter der Kaltwasserleitung auf 55 °C abgekühlt und mit 0,5 m Phosphatpuffer ein pH-Wert von 7,0 eingestellt. Zu der Lösung gibt man 100 mg Proteinase K (Merck Nr. 24568), die in 5 ml SSC gelöst ist, und inkubiert unter ständigem Rühren 15-20 Minuten bei 50 °C in einem Wasserbad.

Nach dem Abkühlen auf Zimmertemperatur wird mit 5 m Natriumperchloratlösung auf 1 m Perchlorat eingestellt, die gut durchmischte Lösung zu gleichen Teilen auf zwei 1 l Flaschen verteilt und mit dem gleichen Volumen Isoamylalkohol-Chloroform (1+24) 20 Minuten bei Zimmertemperatur geschüttelt. Man gießt die milchige Emulsion in Zentrifugenbecher und zentrifugiert 20 Minuten mit 9000 UpM bei 4 °C. Die wässrige, klare Oberphase wird vorsichtig abgehoben, in einem Meßzylinder gesammelt, und mit dem gleichen Volumen eiskaltem absoluten Äthanol überschichtet. Durch vorsichtiges Rühren mit einem Glasstab werden beide Lösungen vermischt, wobei die Nukleinsäuren ausgefällt werden und sich auf dem Glasstab aufwickeln lassen.

Die Nukleinsäuren werden durch Schütteln in 100 ml BPE gelöst, die Lösung auf 37 °C erwärmt und mit 10 mg RNase (Merck Nr. 24570) und 10 mg Amylase (Merck Nr. 24507) 30 Minuten bei 37 °C inkubiert. Die RNase wird vor dem Zusatz in 10 ml BPE gelöst, 15 Minuten zum Sieden erhitzt und langsam abkühlen lassen, um DNAsen zu inaktivieren. Obige Lösung wird nach dem Abkühlen auf 20 °C mit festem Natriumperchlorat auf

Für freundliche Ratschläge und Unterstützung bei der Isolation von DNA danke ich Herrn Dr. G. Minet.

5 m eingestellt, die kalte Lösung sofort mit dem doppelten Volumen eisgekühltem Äthanol überschichtet und die DNA ausgefällt.

Die DNA wird in 90 ml BPE gelöst, mit 10 ml 1,8 m NaCl-Lösung versetzt und abermals 4 Stunden bei 50 °C mit 5 mg Proteinase K inkubiert. Nach dem Abkühlen wird dreimal mit dem gleichen Volumen Phenol je 20 Minuten geschüttelt, 20 Minuten bei 9000 UpM zentrifugiert, die wässrige obere Phase abgehoben und nach der letzten Extraktion mit dem doppelten Volumen eiskaltem Äthanol gefällt.

Das verwendete Phenol wird vor der Anwendung im Vakuum destilliert und mit 0,2 m Phosphatpuffer gesättigt, bis die Phenolphase einen pH-Wert von 7,0 hat.

Die DNA wird in 45 ml BPE gelöst, 5 ml 3 m Natriumacetatlösung zugesetzt, und mit 0,54 fachem Volumen eiskaltem Isopropanol ausgefällt. Die Fällung wird wiederum in 45 ml BPE unter Schütteln gelöst, mit 5 ml 1,8 m NaCl-Lösung versetzt und gegen BPES dialysiert, bis die Extinktion des Puffers im Außenraum bei 260 nm und einer Schichtdicke von 4 cm kleiner als 0,05 O.D. ist. Ausbeute: 15-25 mg DNA aus 20 g gefrorenen Zellen.

2.2.2. Micrococcus luteus-DNA (42,102,133)

Die Darstellung der DNA erfolgt bis zur 1. Äthanolfällung analog 2.2.1., nur wird anstelle des SSC-Puffers eine EDTA-NaCl-Lösung verwendet.

Die ausgefällten Nukleinsäuren werden in 112 ml BPE gelöst, mit einigen Tropfen wässriger Toluidinblaulösung versetzt, so daß die Lösung schwach blau gefärbt ist, und anschließend mit 117,5 g CsCl auf eine Dichte von ca. 1,70 g/cm³ eingestellt.

Man füllt die Lösung in Zentrifugenbecher, überschichtet mit flüssigem Paraffin und zentrifugiert in der präparativen Ultrazentrifuge bei 15 °C und 45000 UpM 40 Stunden. Die viskose, durch den Farbstoff blau gefärbte, DNA-Zone ist von dem Sediment getrennt und wird mittels einer Pipette abgehebert und in 60 ml BPES gelöst. Die Lösung wird dann mit dem gleichen Volumen iso-Amylalkohol-Chloroform (1+24) versetzt, 20 Minuten bei Raumtemperatur geschüttelt und anschließend 20 Minuten bei 4 °C mit 9000 UpM zentrifugiert.

Die wässrige DNA-haltige Oberphase wird abgehoben, mit dem gleichen Volumen eiskaltem Äthanol gefällt, in 90 ml BPE gelöst und mit 10 ml 3 m Natriumacetatlösung versetzt. Danach fällt man die DNA mit dem 0,54-fachen Volumen kalten Isopropanol, löst die DNA in 45 ml BPE, setzt 5 ml 1,8 m NaCl-Lösung zu und dialysiert gegen BPES.

2.2.3. Dialyse der DNA-Lösungen

Der auf Rollen gewickelte Dialysierschlauch besteht aus regenerierter Zellulose (Typ: Visking 27/32). Er hat eine Dicke von 25 µm und eine Molekulargewichtsausschlußgrenze von 12000.

Für die Dialyse schneidet man sich ca. 50 cm lange Stücke ab und kocht diese dreimal 20 Minuten in BPES aus, wobei darauf zu achten ist, daß die Schlauchstücke immer mit Flüssigkeit bedeckt sind. Anschließend spült man sie innen und außen mit BPES und kann sie dann bei 4 °C unter BPES aufbewahren.

Für die Dialyse verknotet man ein etwa 50 cm langes Stück auf einer Seite, füllt mittels einer Pipette die DNA-Lösung ein, knotet das andere Ende so zu, daß noch eine Luftblase im Schlauch bleibt, und dialysiert in einem mit BPES gefüllten 1 l Meßzylinder, indem der Schlauch durch die durch einen Rührmagneten erzeugte Strömung in kreisender Bewegung gehalten wird. Der Außenpuffer wird alle 8 Stunden gewechselt, bis

sich in ihm bei 260 nm und einer Schichtdicke von 4 cm weniger als 0,05 O. D. feststellen lassen.

2.2.4. Gehaltsbestimmung der DNA-Lösungen

In eine Quarzküvette mit einer Schichtdicke von 1 cm wird 1,6 ml BPES und 0,4 ml *Bacillus subtilis*- oder *Micrococcus luteus*-DNA-Lösung pipettiert und nach vorsichtigem Durchmischen mittels eines Rührspatels am UV-Spektrometer DMR 21 ein Spektrum der Lösung gegen BPES als Leerwert im Bereich 350-220 nm aufgenommen. Aus der bei 260 nm gemessenen Extinktion wird der Gehalt unter Zuhilfenahme des molaren Extinktionskoeffizienten

ϵ berechnet, wobei für ϵ die von G. F e l s e n f e l d und S. Z. H i r s c h m a n n ¹³⁴⁾ ermittelten Werte verwendet werden:

M. luteus-DNA	6925 cm ² /Mol Nukleotidphosphat
B. subtilis-DNA	6412 cm ² /Mol Nukleotidphosphat

Beispiel: M. luteus: $\epsilon_{\text{Basenpaar}} = 13850 \text{ cm}^2/\text{Mol Basenpaar}$

$$E = 0,490 \cdot \frac{2,0 \text{ ml}}{0,4 \text{ ml}} = 2,45 \text{ O.D./ml}$$

$$c = \frac{2,45}{13850} = 1,77 \cdot 10^{-4} \text{ mMol Basenpaare/ml}$$

B. subtilis: $\epsilon_{\text{Basenpaar}} = 12820 \text{ cm}^2/\text{Mol Basenpaar}$

$$E = 0,411 \cdot \frac{2,0 \text{ ml}}{0,4 \text{ ml}} = 2,055 \text{ O.D./ml}$$

$$c = \frac{2,055}{12820} = 1,6 \cdot 10^{-4} \text{ mMol Basenpaare/ml}$$

2.2.5 Alkalische Hyperchromie

Zu den 2 ml DNA-Lösung aus der Gehaltsbestimmung pipettiert man 0,2 ml 5 m NaOH, mischt mit einem Rührspatel gut durch und bestimmt den Anstieg der UV-Absorption im Maximum, wo-

bei die Quarzküvetten nach dem Füllen sofort vermessen, geleert und gespült werden. Die Absorptionswerte der nativen DNA müssen mindestens um folgende Werte überstiegen werden ⁷⁾:

M. luteus	: 25,3 %
B. subtilis	: 27,5-29 %

Beispiel: 1. M. luteus-DNA

$$E_{\text{alkal.}} = 0,562 \cdot \frac{2,2 \text{ ml}}{0,4 \text{ ml}} = 3,09 \text{ O.D./ml}$$

$$\frac{2,45}{100\%} = \frac{3,09}{x} = x = 126 \% \Rightarrow \text{Alkalische Hyperchromie} \\ = 26 \%$$

2. B. subtilis-DNA

$$E_{\text{alkal.}} = 0,483 \cdot \frac{2,2 \text{ ml}}{0,4 \text{ ml}} = 2,656 \text{ O.D./ml}$$

$$\frac{2,055}{100\%} = \frac{2,656}{x} = x = 129 \% \Rightarrow \text{Alkalische Hyperchromie} \\ = 29 \%$$

3. Gleichgewichtsdialyse 7,42,56,98)

Von der beschriebenen dreiteiligen Dialysekammer wird eine äußere Kammer mit 5 ml *Micrococcus luteus*-DNA und die andere mit 5 ml *Bacillus subtilis*-DNA mittels Meßpipetten gefüllt, wobei die Konzentration der DNA-Lösungen ungefähr 0,1 mg/ml $\cong 1,6 \cdot 10^{-4}$ Mol Basenpaare/l betragen sollte. In die mittlere Kammer gibt man 5 ml einer Lösung des Liganden in BPES mit einer Konzentration von $2 \cdot 10^{-5}$ - $1 \cdot 10^{-4}$ Mol/l, je nach Größe des Extinktionskoeffizienten. Nach 48-stündiger Gleichgewichtseinstellung werden aus allen drei Kompartimenten gleiche Volumina an Lösung entnommen, mit 10 % SDS-Lösung versetzt, um den Komplex aus DNA und Ligand zu zerstören, und folgende Messungen vorgenommen:

1. Lösung der mittleren Kammer gegen Leerwert
2. Lösung der B. subtilis-Kammer gegen Lösung der mittleren Kammer
3. Lösung der M. luteus-Kammer gegen Lösung der mittleren Kammer.

Hierbei entspricht Messung 1 dem nicht gebundenen Anteil an Ligand m, während Messung 2 und 3 den jeweils an DNA gebundenen Anteil angibt, der auf Grund der unterschiedlichen Basenzusammensetzung der DNA's verschieden groß ist. Läßt sich die Konzentration der mittleren Kammer nicht mehr UV-spektroskopisch bestimmen, so wird der Gehalt obiger mit SDS versetzter Lösung fluorimetrisch vermessen, indem im Anregungsmaximum der Substanz angeregt und die Fluoreszenzintensität im Emissionsmaximum ermittelt wird. Unter gleichen Bedingungen wird vorher eine Eichgerade aufgestellt, indem Lösungen entsprechender Konzentration durch Verdünnen einer Stammlösung hergestellt werden, SDS zugesetzt wird, und eine fluorimetrische Messung erfolgt.

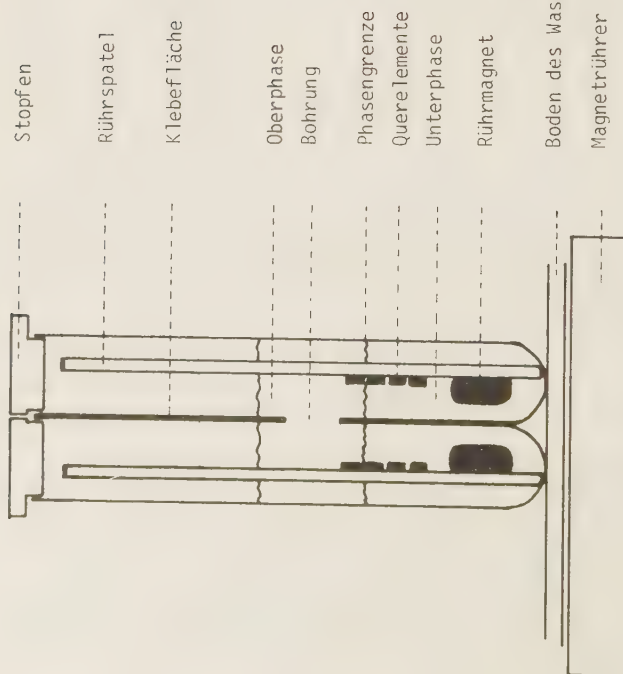
Nach den Messungen werden die Kammerinhalte mit der jeweiligen DNA-Lösung bzw. mit Puffer zu 5 ml ergänzt und wiederum äquilibriert. Man erhält auf diese Weise verschiedene Konzentrationswerte des gebundenen und freien Liganden bei unterschiedlicher Gesamtligandenkonzentration, aus denen man analog der bei der Differentialverteilung beschriebenen Methode Affinitäts- und Spezifitätsparameter für die untersuchte Verbindung errechnen kann.

4. Differentialverteilungsmethode

4.1. Durchführung

4.1.1. Aufbau der Kammer

Ein Polystyrolreagensglas (13 ml Fa. Sarstedt) wird in einer Höhe von 3,8 cm vom Boden beginnend mittels eines Bohrers mit



a)

b)

c)

Abbildung 28: Aufbau der Kammer für die Differentialverteilungsmethode

a) Seitenansicht der Kammer

b) Teilelement mit Bohrung (Größenangaben in mm)

c) Rührspatel (Größenangaben in mm)

einem 5 mm breiten und 1 cm hohen Schlitz versehen. Zwei solcher Röhrchen werden dicht zusammengeklebt, so daß Bohrung auf Bohrung zu liegen kommt, indem man Polystyrol in Trichloräthylen (1+4) auflöst und mit der entstehenden dickflüssigen Masse die Klebeflächen bestreicht; anschließend werden die Röhrchen fest zusammengepreßt und in Höhe der Bohrungen liegend zusätzlich Polystyrollösung aufgetragen, um die Kammer vollends abzudichten.

Als Rührer werden Polystyrol Rührspatel (Fa. Sarstedt) verwendet, bei denen analog Abb. 28 ein stets gleich orientierter Rührmagnet und 4 Querelemente aus Polystyrol angebracht werden. Dieses erfolgt mit der oben erwähnten Polystyrolmasse durch Bestreichen des Rührspatels an den Klebeflächen, Ankleben der Querelemente und des teflonüberzogenen Magnets (1cm lang, $\varnothing$ 5 mm) und anschließendem vollständigen Überziehen des Magnets mit dieser Masse. Die Kammer ist nach 12-stündigem Aushärten an der Luft gebrauchsfertig und wird anschließend durch Füllen mit Puffer und Oktanol auf Dichtigkeit geprüft.

4.1.2. Ausführung

Man füllt den linken Teil der Kammer mit 4 ml M. luteus-DNA ($c \sim 0,05$ mg/ml), den rechten Teil mit 4 ml Bacillus subtilis-DNA ($c \sim 0,05$ mg/ml), wobei der Meniskus der Lösungen sich 9 mm unterhalb der Bohrung befindet, und überschichtet beide mit insgesamt 4 ml einer Lösung der zu untersuchenden Substanz ($c \sim 2 \cdot 10^{-5}$ Mol/l) in Oktanol bzw. Hexanol. Nun wird in jedes Röhrchen vorsichtig ein Rührspatel mit Magnet gestellt (siehe Abb. 28), wobei sich beide Magneten abstoßen müssen, damit nachher eine Drehung stattfindet. Die Kammer wird mit zwei Stopfen verschlossen und in einem 25 °C warmen Wasserbad (Bodenstärke 0,3 cm) über einem IKA-Magnetrührer mittels einer Klammer befestigt. Die Drehgeschwindigkeit des Magnetrührers ist so einzuregeln, daß sich die Rührspatel mit ca. 80 U/min drehen, wobei keine Tröpfchenbildung stattfinden darf, um ei-

ne Vermischung beider Unterphasen zu vermeiden.

Nach 24-stündiger Gleichgewichtseinstellung wird die Konzentration an Ligand in beiden Unterphasen nach Zusatz von 10 % SDS-Lösung durch UV-Messung unter Benutzung des molaren Extinktionskoeffizienten in mit Oberphase gesättigtem Puffer + 10 % SDS-Lösung bestimmt. Die Konzentration der Oberphase wird ebenfalls durch UV-Messung über den molaren Extinktionskoeffizienten der Substanz in mit Unterphase gesättigter Oberphase oder fluorimetrisch mittels einer Eichkurve bestimmt. Zur Aufnahme der Eichkurve werden durch Verdünnung einer Stammlösung entsprechende Konzentrationen hergestellt und durch Anregung im Excitationsmaximum und Messung im Emissionsmaximum der Verbindung die relative Intensität der Fluoreszenz am Zeiss Fluorimeter bestimmt, wobei der Fluoreszenzstandard F 53 der Fa. Zeiss als Standard zur Abgleichung des Fluorimeters dient und in senkrechter Küvettenstellung gemessen wird. Die logarithmische Auftragung der Fluoreszenzintensität gegen die Konzentration ergibt eine Gerade, aus der direkt die Konzentration der unbekannten Lösung ermittelt werden kann.

Der zur Berechnung der freien Konzentration notwendige Verteilungskoeffizient wird analog bestimmt. Als Unterphasedienten hier 4 ml Puffer anstelle der DNA-Lösungen.

Das Bindungsverhalten der Substanz wird durch Variation ihrer Konzentration in verschiedenen Kammern ermittelt, wobei von einer Gesamtkonzentration von $\sim 2 \cdot 10^{-5}$ Mol/l ausgegangen und pro Kammer die Gesamtkonzentration etwa auf die Hälfte der vorhergehenden Bestimmung reduziert wird.

Für die Anfertigung des Wasserbades und die Durchführung der Bohrarbeiten danke ich herzlich Herrn Werkstattmeister W. Keller.

4.2. Theoretische Grundlagen der Auswertung

4.2.1. Spezifität

Bei einer bestimmten freien Konzentration m , die durch Division der gefundenen Konzentration durch den Verteilungskoeffizienten ermittelt wird ^{77,80)}, erhält man verschiedene Mengen von an DNA gebundenem Ligandenanteil, die mit c_{BS} und c_{ML} bezeichnet werden sollen. Der Quotient aus c_{BS} bzw. c_{ML} und der Konzentration der eingesetzten DNA liefert einen Wert r_{BS} bzw. r_{ML} , der den Beladungszustand der DNA charakterisiert ⁷⁾, d. h. er gibt an, wieviel Basenpaare der DNA durch Ligand besetzt sind.

$$m = \frac{c_0}{K} \quad \begin{array}{l} c_0 = \text{gefundene Oberphasenkonzentration in Mol/l} \\ K = \text{Verteilungskoeffizient} \end{array}$$

$$r_{BS} = \frac{c_{BS}}{c_{DNA_{BS}}} \quad r_{ML} = \frac{c_{ML}}{c_{DNA_{ML}}} \quad \begin{array}{l} c_{BS} = c_{BS_{ges}}^{-m} \\ c_{ML} = c_{ML_{ges}}^{-m} \end{array}$$

$c_{DNA_{BS}}$ = Konzentration der *B. subtilis*-DNA in Mol Basenpaare/l

$c_{DNA_{ML}}$ = Konzentration der *M. luteus*-DNA in Mol Basenpaare/l

$c_{BS_{ges}}$ bzw. $c_{ML_{ges}}$ = gemessene Konzentration der Unterphase der DNA_{BS} - bzw. DNA_{ML} -Kammer in Mol/l

Die Spezifität eines Liganden ⁷⁾ für bestimmte Basenpaare ergibt sich aus dem Quotienten α' der beiden Beladungswerte der DNA bei gleicher freier Konzentration:

$$\alpha' = \frac{r_{ML}}{r_{BS}}$$

Man erhält also mit fallendem r nach der oben beschriebenen Methode jeweils unterschiedliche α' -Werte. Trägt man in einem Diagramm die α' -Werte gegen r_{BS} auf, so erhält man eine Kurve, deren Schnittpunkt mit der Ordinate als α bezeichnet wird:

$$\alpha = \lim_{r \rightarrow 0} \alpha'$$

Die Extrapolation wird durchgeführt, da durch $r=0$ das Bindungsverhalten eines einzelnen Moleküls repräsentiert wird ohne eine Komplikation der Einschränkung der Bindungsstellen durch Nachbarschaftsausschlüsse ⁷⁾ (Abb. 5,7).

4.2.2. Affinität

Besitzt ein Polymeres mehr als eine Bindungsstelle für einen Liganden, so läßt sich nach dem Massenwirkungsgesetz ableiten ^{56,135)}:

$$\frac{r}{m} = K_{app} \cdot (B_{app} - r)$$

r = Beladungsgrad = Quotient aus gebundener Ligandenkonzentration und Konzentration des Polymeren

m = freie Ligandenkonzentration

K_{app} = apparente Bindungskonstante

B_{app} = apparente Zahl von Bindungspunkten

Die graphische Darstellung von $\frac{r}{m}$ gegen r , die als Scatchard-Plot ¹³⁵⁾ bezeichnet wird, ergibt eine Gerade, wenn die zu untersuchenden Bindungsstellen äquivalent und voneinander unabhängig sind.

Aus dem Schnittpunkt mit der Abszisse kann man die Anzahl der Bindungspunkte B_{app} ermitteln ⁷⁾. Der durch Extrapolation erhaltene Ordinatenabschnitt gibt einen Affinitätsparameter ϕ_n , der durch folgende Gleichung wiedergegeben wird:

$$\lim_{r \rightarrow 0} \frac{r}{m} = \sum_i K_i \cdot B_i = \sigma$$

In die Spezifitätsgleichung $\alpha = \lim_{r \rightarrow 0} \frac{r_{ML}}{r_{BS}}$ eingesetzt,

folgt:
$$\alpha = \frac{\sigma_{ML}}{\sigma_{BS}}$$

d. h. die Spezifität eines Liganden zu DNA-Basenpaaren ist der Quotient seiner Affinitäten.

Die Anzahl der Bindungsstellen B_i pro Basenpaar ergibt sich bei nicht interkalierenden Liganden aus dem Prozentgehalt der DNA an AT-Basenpaaren, da jedes Basenpaar eine mögliche Bindungsstelle darstellt. Für das System *B. subtilis*-DNA (55,5 % AT) und *M. luteus*-DNA (27,5 % AT) gilt,

$$B_{ML} = f_{AT} = 0,275$$

$$B_{BS} = f_{AT} = 0,555$$

was einen Spezifitätsparamter $\alpha = \frac{0,275}{0,555} = 0,5$ ergeben würde ⁷⁾.

Werte von $\alpha < 0,5$ bedeuten, daß für eine optimale Bindung entweder mehrere gleiche Basenpaare erforderlich sind, und/oder die Bindung an beiden Seiten eines Basenpaares erfolgen kann. Für zwei benachbarte AT-Paare als optimale Bindungsstelle gilt ⁷⁾:

$$\alpha = \frac{f_{AT}^2 (DNA_{ML})}{f_{AT}^2 (DNA_{BS})} = 0,25 \text{ Allgemein: } \alpha = 0,5^n$$

Für drei benachbarte AT-Paare gilt also: $\alpha = 0,12$

Der Kehrwert der Bindungsstellen B_i , d. h. des Abszissenabschnittes, gibt die Basenpaare n an, die ein Ligand bei der Bindung beansprucht, während aus der Steigung der Kurve die Bindungskonstante K abgelesen werden kann.

Daß die Scatchard-Auftragung keine Gerade, sondern in Richtung hoher Beladungswerte r eine Kurve ergibt, kann so interpretiert werden, daß es mehr als eine Art von Bindungsstellen gibt und/oder daß Ligand-Ligand Interaktionen auftreten¹⁰²⁾.

4.3. Berechnungsbeispiel

Bestimmung des molaren Extinktionskoeffizienten ϵ von Nr. 4

1 ml einer Lösung des Liganden in mit Hexanol-(1) gesättigtem BPES ($c = 1,91 \cdot 10^{-5}$ Mol/l) wird in eine Quarzküvette pipettiert und das Spektrum im Bereich 600-250 nm aufgenommen. Die Extinktion im langwelligsten Maximum bei 354 nm wird bestimmt und daraus der Extinktionskoeffizient berechnet:

$$E = 0,363 \Rightarrow \epsilon = \frac{E}{c \cdot d} = \frac{0,363}{1 \text{ cm} \cdot 1,91 \cdot 10^{-5} \text{ Mol/l}} = 19000 \text{ Mol}^{-1} \text{ cm}^{-1} \text{ l}$$

Zu dieser Lösung pipettiert man 0,1 ml SDS-Lösung und bestimmt wiederum die Extinktion im langwelligsten Maximum bei 367 nm:

$$E = 0,353 \quad E_{\text{kor.}} = 0,353 \cdot \frac{1,1 \text{ ml}}{1,0 \text{ ml}} = 0,388 \text{ O.D./ml} \Rightarrow$$

$$\epsilon = \frac{0,388}{1,91 \cdot 10^{-5} \text{ Mol/l} \cdot 1 \text{ cm}} = 20300 \text{ Mol}^{-1} \text{ cm}^{-1} \text{ l}$$

1 ml einer Lösung des Liganden in BPES gesättigtem Hexanol-(1) ($c = 2,68 \cdot 10^{-5}$ Mol/l) liefert eine Extinktion von 0,574 bei 363 nm, woraus sich folgender Extinktionskoeffizient errechnet:

$$\epsilon = \frac{0,574}{2,68 \cdot 10^{-5} \text{ Mol/l} \cdot 1 \text{ cm}} = 21400 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1} \text{ l.}$$

Bestimmung des Verteilungskoeffizienten

Man überschichtet 2x4 ml BPES in der Differentialverteilungskammer mit 4 ml einer Lösung des Liganden in Hexanol-(1) ($c = 2,97 \cdot 10^{-5}$ Mol/l), wobei die Lösung durch Schütteln einer konzentrierten Lösung des Liganden in BPES mit Hexanol-(1) hergestellt wird.

Nach 24-stündiger Gleichgewichtseinstellung wird ein Spektrum der Oberphase und, nach 10 % SDS-Zusatz, der Unterphase aufgenommen:

$$E_{\text{ooben}} = 0,236 \Rightarrow c_{\text{ooben}} = \frac{E_{\text{ooben}}}{\epsilon_o \cdot d} = \frac{0,236}{21400 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1} \cdot 1,1 \text{ cm}} = 1,10 \cdot 10^{-5} \text{ Mol/l}$$

$$E_{\text{unten}} = 0,651 \Rightarrow E_{\text{korr.}} = \frac{0,651 \cdot 1,1 \text{ ml}}{1,0 \text{ ml}} = 0,716 \text{ O.D./ml}$$

$$c_{\text{unten}} = \frac{0,716}{20300 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1} \cdot 1,4 \text{ cm}} = 8,82 \cdot 10^{-6} \text{ Mol/l}$$

$$K = \frac{c_{\text{ooben}}}{c_{\text{unten}}} = \frac{1,10 \cdot 10^{-5} \text{ Mol/l}}{8,86 \cdot 10^{-6} \text{ Mol/l}} = 1,25$$

Es wurden weitere Ansätze mit verschiedenen Gesamtligandenkonzentrationen gemacht und die in Tab. 6 aufgeführten Werte ermittelt:

Nr.	c_{ooben} (Mol/l)	c_{unten} (Mol/l)	Verteilungskoeffizient
1	$1,48 \cdot 10^{-5}$	$1,17 \cdot 10^{-5}$	1,26
2	$1,10 \cdot 10^{-5}$	$8,82 \cdot 10^{-6}$	1,25
3	$7,31 \cdot 10^{-6}$	$5,94 \cdot 10^{-6}$	1,23
4	$4,16 \cdot 10^{-6}$	$3,62 \cdot 10^{-6}$	1,15
5	$3,97 \cdot 10^{-6}$	$2,87 \cdot 10^{-6}$	1,38
6	$2,45 \cdot 10^{-6}$	$2,13 \cdot 10^{-6}$	1,15
7	$2,06 \cdot 10^{-6}$	$1,34 \cdot 10^{-6}$	1,53

Der Verteilungskoeffizient wird graphisch bestimmt, indem durch die Punkte eine Regressionsgerade gelegt wird (Abb. 6): $K = 1,25$.

Differentialverteilungsanalyse

$$c_{\text{DNA}_{\text{ML}}} = 7,35 \cdot 10^{-5} \text{ Mol-Basenpaare/l}$$

$$c_{\text{DNA}_{\text{BS}}} = 7,79 \cdot 10^{-5} \text{ Mol-Basenpaare/l}$$

Je 4 ml der DNA_{BS} und 4 ml DNA_{ML} werden mit 4 ml einer Lösung des Liganden in Hexanol-(1) ($c = 3,15 \cdot 10^{-5} \text{ Mol/l}$) überschichtet, und nach 24-stündiger Gleichgewichtseinstellung wird die Extinktion der Oberphase vermessen:

$$E_{\text{oben}} = 0,373 \Rightarrow c = \frac{E_{\text{oben}}}{\epsilon_o \cdot d} = \frac{0,373}{21400 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1} \cdot 1,4 \text{ cm}} = 4,36 \cdot 10^{-6} \text{ Mol/l}$$

$$m = \frac{c_{\text{oben}}}{K} = \frac{4,36 \cdot 10^{-6} \text{ Mol/l}}{1,25} = 3,49 \cdot 10^{-6} \text{ Mol/l}$$

m entspricht hierbei der freien Konzentration an Ligand in der Unterphase.

In Küvetten mit einer Schichtdicke von 2 cm pipettiert man je 2 ml Unterphase, versetzt jeweils mit 0,2 ml SDS-Lösung und nimmt ebenfalls die Spektren auf:

$$E_{\text{DNA}_{\text{BS}}} = 0,631 \quad E_{\text{korr}} = \frac{0,631 \cdot 1,1 \text{ ml}}{1,0 \text{ ml}} = 0,694 \text{ O.D./ml}$$

$$c_{\text{BS}_{\text{ges}}} = \frac{0,694}{20300 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1} \cdot 1,2 \text{ cm}} = 1,71 \cdot 10^{-5} \text{ Mol/l}$$

$$E_{\text{DNA}_{\text{ML}}} = 0,371 \quad E_{\text{korr}} = \frac{0,371 \cdot 1,1 \text{ ml}}{1,0 \text{ ml}} = 0,408 \text{ O.D./ml}$$

$$c_{\text{ML}_{\text{ges}}} = \frac{0,408}{20300 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1} \cdot 1,2 \text{ cm}} = 1,00 \cdot 10^{-5} \text{ Mol/l}$$

Zur Berechnung des jeweils gebundenen Anteils muß der sich noch in der Lösung befindliche freie Anteil abgezogen werden:

$$c_{\text{BS}} = c_{\text{BS}_{\text{ges}}} - m = 1,71 \cdot 10^{-5} \text{ Mol/l} - 3,49 \cdot 10^{-6} \text{ Mol/l} = 1,36 \cdot 10^{-5} \text{ Mol/l}$$

$$c_{\text{ML}} = c_{\text{ML}_{\text{ges}}} - m = 1,00 \cdot 10^{-5} \text{ Mol/l} - 3,49 \cdot 10^{-6} \text{ Mol/l} = 6,51 \cdot 10^{-6} \text{ Mol/l}$$

Der Quotient aus der jeweils gebundenen Ligandenkonzentration und der DNA-Konzentration ergibt den Beladungsgrad r :

$$r_{BS} = \frac{c_{BS}}{c_{DNA_{BS}}} = \frac{1,36 \cdot 10^{-5} \text{ Mol/l}}{7,79 \cdot 10^{-5} \text{ Mol/l}} = 0,174$$

$$r_{ML} = \frac{c_{ML}}{c_{DNA_{ML}}} = \frac{6,51 \cdot 10^{-6} \text{ Mol/l}}{7,35 \cdot 10^{-5} \text{ Mol/l}} = 0,0886$$

Die Division dieser Werte durch m ergibt einen Affinitätswert $\frac{r}{m}$:

$$\frac{r_{BS}}{m} = \frac{0,174}{3,49 \cdot 10^{-6}} = 4,99 \cdot 10^4$$

$$\frac{r_{ML}}{m} = \frac{0,0886}{3,49 \cdot 10^{-6}} = 2,54 \cdot 10^4$$

Der Spezifitätsparameter α' ergibt sich zu $\alpha' = \frac{r_{ML}}{r_{BS}} = \frac{0,0886}{0,174} = 0,509$.

Es werden insgesamt 8 Kammern angesetzt, deren Gesamtligandenkonzentration im Bereich von $3,15 \cdot 10^{-5} \text{ Mol/l}$ - $4,6 \cdot 10^{-6} \text{ Mol/l}$ liegt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 7 dargestellt:

Messung	$m \cdot 10^{-7} (\text{Mol/l})$	r_{BS}	$r_{BS}/m \cdot 10^4 (\text{M}^{-1})$	r_{ML}	$r_{ML}/m \cdot 10^4 (\text{M}^{-1})$	α'
1	34,9	0,174	4,99	0,0886	2,54	0,509
2	22,9	0,146	6,40	0,0625	2,73	0,426
3	15,4	0,150	9,75	0,0496	3,22	0,330
4	12,0	0,142	11,9	0,0367	3,06	0,257
5	6,84	0,112	16,4	0,0255	3,72	0,227
6	5,17	0,0982	19,0	0,0218	4,21	0,221
7	3,22	0,0784	24,4	0,0140	4,40	0,180
8	1,41	0,0468	33,2	0,00702	5,00	0,150

Die graphische Darstellung von α' gegen r_{BS} (Abb. 5) liefert als Ordinatenabschnitt einen extrapolierten α -Wert von 0,12. Dies entspricht einer Beanspruchung von 3 AT-Paaren als optimale Bindungsstelle. Die Darstellung von r_{BS} bzw. r_{ML} gegen r_{BS}/m bzw. r_{ML}/m (Abb. 5) gibt als extrapolierten Ordinatenabschnitt den Affinitätsparameter ϕ an:

$$\phi_{BS} = 48 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \quad \phi_{ML} = 5,3 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}$$

Ein berechneter α -Wert ergibt sich zu:

$$\alpha = \frac{\phi_{ML}}{\phi_{BS}} = \frac{5,3 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}}{48 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}} = 0,11$$

Legt man im linearen Teil der DNA_{BS} -Kurve eine Tangente an, so kann man aus deren Steigung die Bindungskonstante K_{app} errechnen:

$$K_{app} = - \frac{48 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}}{0,16} = - 3,0 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}.$$

Der Schnittpunkt dieser Geraden mit der Abszisse ergibt die apparente Anzahl von Bindungspunkten $B_{app} = 0,16$, während der Kehrwert die Anzahl der Basenpaare anzeigt, die ein Ligand beansprucht:

$$n = \frac{1}{B_{app}} = \frac{1}{0,16} = 6,2.$$

4.4. Variation der Auswertungsmethode

Die Erklärung in Abschnitt 4.2.2. für eine Abweichung des Scatchard-Plots von einer Geraden ist ausreichend, wenn der Ligand nur an eine sich wiederholende Stelle der DNA, d. h. an eine Base oder an ein Basenpaar gebunden wird. Wenn jedoch ein Ligand zwei oder mehr Basenpaare benötigt, so können sich potentielle Bindungsstellen überlappen, und bei ei-

nem bestimmten Beladungsgrad hängt die Anzahl der freien Bindungsstellen nicht nur von der Menge des bereits gebundenen Liganden ab, sondern auch von der Verteilung dieses Liganden auf der DNA, wodurch ebenfalls eine Abweichung von der Linearität beim Scatchard-Plot hervorgerufen wird ⁶⁷⁾.

Für nicht kooperativ bindende Liganden leiteten J. D. McGhee und P. H. von Hippel ⁶⁷⁾ eine der Scatchardauswertung analoge Gleichung ab:

$$\frac{r}{m} = K \cdot (1-n \cdot r) \cdot \left(\frac{1-n \cdot r}{1-(n-1) \cdot r} \right)^{n-1}$$

r = Beladungsgrad m = freie Ligandenkonzentration
 n = Anzahl der Bindungsstellen K = Bindungskonstante

Diese Gleichung stellt für $n=1$ die Scatchardauftragung dar, während für $n \geq 2$ durch den Klammerausdruck die Krümmung der Kurve bestimmt wird. Als Bindungskonstante K wird der Schnittpunkt der Kurve mit der Ordinate betrachtet und ist damit dem Affinitätsparameter ϕ analog. Der Vorteil dieser Auswertungsmethode besteht darin, daß die Anzahl der Basenpaare n , die ein Ligand für eine optimale Bindung benötigt, nicht wie bei der Scatchardauftragung durch Extrapolation ermittelt wird, was zu Fehlern führen kann, wenn der Kurvenverlauf sehr flach ist, sondern im Zuge der Auswertung obiger Gleichung errechnet wird ⁶⁷⁾. Hierbei setzt man für r und m die gefundenen Werte ein, und mittels eines Computerprogramms der University of California, Los Angeles, werden in einer nicht linearen Regressionsanalyse die geschätzten K und n Werte so lange variiert, bis die Summe der Quadrate der Abweichungen der errechneten Werte von den gefundenen Werten ein Minimum annimmt.

Es wurde für DIPI (Nr. 4) eine Modellrechnung durchgeführt und die Ergebnisse der Scatchardauswertung gegenübergestellt:⁺

von Hippe l		Scatchard	
$K_{BS} = 4,7 \cdot 10^5$	$n_{BS} = 3,82$	$\phi_{BS} = 4,8 \cdot 10^5$	$n_{BS} = 6,2$
$K_{ML} = 4,8 \cdot 10^4$	$n_{ML} = 3,9$	$\phi_{ML} = 5,3 \cdot 10^4$	$n_{ML} \sim 9$

Die berechneten Bindungskonstanten nach v o n H i p p e l ⁶⁷⁾ stimmen recht gut mit den Affinitätsparametern nach S c a t - c h a r d ¹³⁵⁾ überein, während die Anzahl aller Basenpaare n, die rechnerisch auf einen gebundenen Liganden entfallen, bei der Scatchardauftragung mit n=6,2 gegen 3,8 und n~9 gegen n=3,9 sehr hoch ausfällt, was auch M c G h e e und v o n H i p p e l berichten ⁶⁷⁾.

⁺Herrn Diplommathematiker Dr. H. Prestele vom Institut für Medizinische Statistik und Dokumentation bin ich für sein freundliches Entgegenkommen durch Ausführung der Computerberechnungen herzlich dankbar.

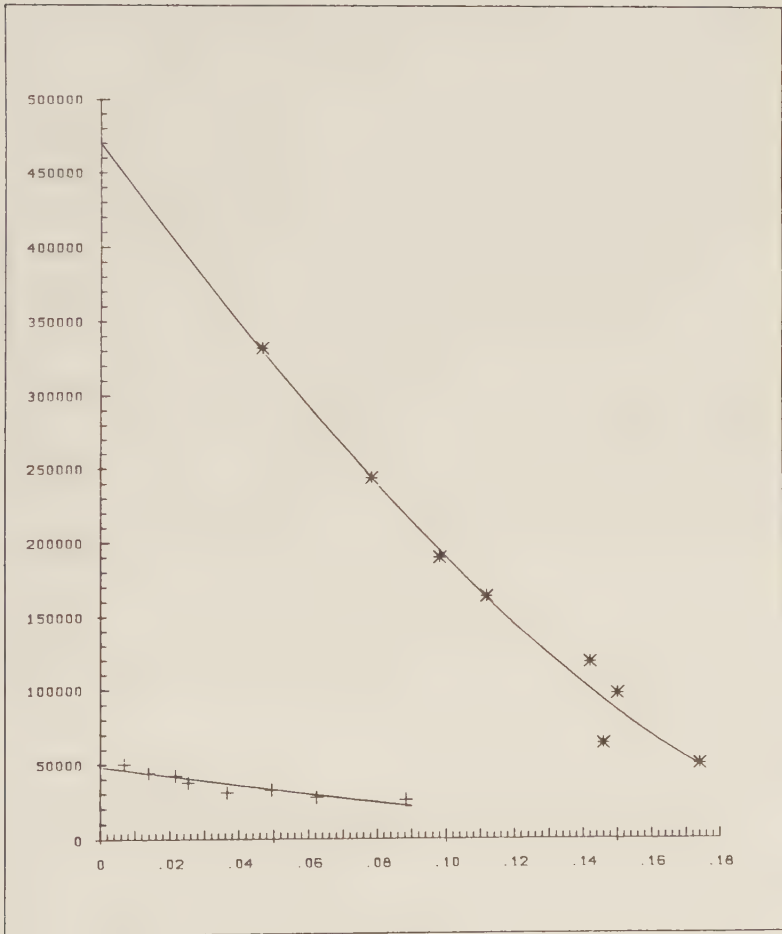


Abbildung 29: Bindungsisothermen nach der Verteilungsmethode für DIPI (Nr. 4), berechnet nach der Gleichung von J. D. McGhee und P. H. von Hippel⁶⁷

Abszisse: Beladungsgrad r Ordinate: $\frac{r}{m}$ in M^{-1}

* *B. subtilis*-DNA + *M. luteus*-DNA

5. Gelelektrophorese von Plasmid-DNA ^{94,97,102)}+

5.1. Herstellung der Gele

1 g Agarose (Seakem) wird in einem Erlenmeyerkolben mit 99 g Elektrophoresepuffer versetzt und fünfmal 30 Sekunden in einem Microtherm 660 Mikrowellenherd (bei 60 °C) erhitzt, wobei zwischenzeitlich gerührt wird, und die Agaroselösung ein völlig klares Aussehen annimmt. Der Erlenmeyerkolben wird mit Parafilm verschlossen und die Agaroselösung bis zur Verwendung in einem Wasserbad bei 50 °C gehalten. Je 5 ml Agaroselösung werden in ebenfalls auf 50 °C vortemperierte verschraubbare Reagensgläser pipettiert, mit unterschiedlichen Volumina einer Stammlösung des zu untersuchenden Liganden in Elektrophoresepuffer versetzt und mit Elektrophoresepuffer auf ein Gesamtvolumen von 5,5 ml ergänzt. Die zuzusetzende Menge an Ligand läßt sich aus der Scatchardauftragung der *B. subtilis*-DNA mit ähnlicher Basenzusammensetzung ermitteln, da für jede freie Konzentration m ein Beladungsgrad r nach der Gleichung $r = m \cdot \phi$ festgelegt ist, wobei ein Beladungsbereich von $r=0$ bis $r=0,15$ gewählt wurde.

Die Reagensgläser werden verschlossen und gut durchgeschüttelt, um homogene Lösungen zu erhalten, wobei ein direkter Lichteinfall bei dieser und allen nachfolgenden Prozeduren zu vermeiden ist, um eine Zersetzung der Substanz zu verhindern.

Die Lösungen werden in die auf 50 °C vorgewärmten Elektrophoreseröhrchen, die unten mit Parafilm verschlossen sind, mittels vorgewärmter Pasteurpipetten (150 mm) eingefüllt und 1 Stunde zur Ausbildung des Gels bei Raumtemperatur in einer Halterung senkrecht stehen gelassen.

Das gebildete Agarosegel wird durch leichtes Klopfen etwas aus dem Röhrchen herausgeschüttelt und 1 cm mit einem Skalpell abgeschnitten, damit eine ebene Auftragsfläche entsteht. Anschließend läßt man das Gel in das Röhrchen zurückgleiten und ersetzt den Parafilm am unteren Ende durch ein Nylongewebe, das mit einem Gummiring befestigt wird. Die Röhrchen werden in die Elektrophoreseapparatur eingespannt und mit Elektrophoresepuffer mittels einer Pipette überschichtet, um ein Austrocknen der Gele zu verhindern.

5.2. Elektrophorese

Man füllt die Elektrophoresekammer mit 4,3 l Elektrophoresepuffer und temperiert diesen mittels eines Thermostaten auf 20,0 °C, wobei die Temperatur mit einem Thermometer direkt im Puffer gemessen wird. Während der Elektrophorese wird der Puffer durch eine eingebaute Pumpe ständig umgepumpt, um Ionengradienten zu vermeiden.

Die vorbereiteten Agaroseröhrchen werden in die Elektrophoreseapparatur eingespannt, und jedes Röhrchen wird knapp über der Geloberfläche mittels einer Eppendorfpipette mit 20 µl folgender Auftragslösung beschickt:

45 µl DNA pBr 322 in 0,01 m Tris/0,001 m EDTA pH=7,1 (c=0,175 mg/ml)

250 µl Auftragspuffer

5 µl Glycerinlösung (Glycerin/Wasser 1:1 + 0,5 % Bromphenolblau)

3-10 µl Ligandenlösung in Elektrophoresepuffer ($r = 0,15$)

Daraufhin werden die Röhrchen unter die Pufferoberfläche geschoben, der Elektrophoreseapparat wird verschlossen und an den Elektroden eine Gleichspannung von 60 V angelegt, wobei ein Strom von ca. 0,05 A pro Röhrchen fließt. Die Elektrophorese wird so lange durchgeführt, bis das Bromphenolblau etwa die Hälfte des Gels durchwandert hat, was nach 5,5 Stunden der Fall ist.

⁺ Diese Versuche wurden am MPI für Biochemie, Abt. Viroidforschung, bei Herrn Prof. W. Müller ausgeführt.

5.3. Detektion

Die Gele werden der Elektrophoresekammer entnommen, aus den Röhrchen herausgeschüttelt, unten abgeschnitten, auf einem Transilluminator zur Kontrolle betrachtet und anschließend in verschraubbaren Reagensgläsern liegend 15 Minuten in der Färbelösung sanft geschaukelt.

Nach der Färbung werden die Gele auf einen Transilluminator gelegt ($\lambda = 254 \text{ nm}$), wodurch die durch Ethidium gefärbten DNA-Banden deutlich sichtbar werden. Mit einer Linhof Repro Camera 9x12 mit vorgeschaltetem Rotfilter wird eine photographische Aufnahme gemacht, indem der eingelegte Film 2 Minuten belichtet wird.

6. Fluoreszenzmessungen

6.1. Fluoreszenzspektren

Eine Stammlösung der zu untersuchenden Substanz in BPES-Puffer wird auf eine Konzentration von $3,9 \cdot 10^{-7} \text{ Mol/l}$ durch Verdünnung mit BPES eingestellt, 3,0 ml dieser Lösung in eine Quarzküvette pipettiert, und am Kontron SMF-23 Spektralfluorometer das Emissions- und Excitationsmaximum ermittelt. Anschließend wird durch Anregung im Excitationsmaximum ein Emissionsspektrum aufgenommen. Für die Auswertung werden die relativen Skalenteile der Fluoreszenz verwendet, da nur ein Vergleich DNA-haltiger und DNA-freier Lösungen von Interesse ist.

Bei den Herren Prof. W. Heumann und Dr. A. Rösch vom Lehrstuhl für Mikrobiologie bedanke ich mich recht herzlich für die Überlassung der Plasmid-DNA (pBr 322).

Desgleichen wird ein Spektrum einer Lösung von *B. subtilis*-DNA ($L/B = 0,05$) mit gleicher Ligandenkonzentration ermittelt (Abb. 22-25).

6.2. Abhängigkeit der Fluoreszenz von der Basenzusammensetzung der DNA

Zur Lösung der DNA in BPES ($c \sim 7 \cdot 10^{-6}$ Basenpaare/l) wird jeweils eine kleine Menge (10-20 μ l) Ligandenlösung ($c \sim 3 \cdot 10^{-6}$ Mol/l) mittels einer Eppendorfpipette gegeben, mit einem Spatel umgerührt, und die relativen Skalenteile der Fluoreszenz im Emissionsmaximum bei Anregung im Excitationsmaximum ermittelt. DNA's werden verwendet von *Clostridium perfringens* (73,5 % AT, Sigma Nr. D-5139), *Bacillus subtilis* (55,5 % AT) und *Micrococcus luteus* (27,5 % AT). Aus der unter Berücksichtigung der Verdünnung der Lösungen durch Ligandenzusatz errechneten DNA- und Ligandenkonzentration wird ein Beladungswert ermittelt und dieser gegen die relativen Fluoreszenzintensitäten graphisch aufgetragen (Abb. 18-21).

7. Belichtungsversuche

Für die Durchführung der Versuche wird eine Labortauchlampe S 81 ¹³⁶⁾ der Firma Hanau verwendet, die durch einen Mantel mit strömendem Leitungswasser gekühlt wird und sich in einem innen mit Aluminiumfolie ausgekleideten Karton befindet.

Die Substanzlösungen ($c \sim 2,5 \cdot 10^{-6}$ Mol/l) werden in allseits klare 1 cm Quarzküvetten pipettiert, welche bei den Versuchen direkt an den äußeren Mantel der Tauchlampe in Höhe des Brenners angelehnt werden. Man bestrahlt jeweils 2 Küvetten gleichzeitig, indem diese links und rechts der Lampe in gleichen Stellungen positioniert werden, wobei sich die Gleichwertigkeit der Positionen aus einem Vorversuch ergibt. Eine

Küvette ist mit der Ligandenlösung gefüllt, während in der anderen Küvette die gleiche Ligandenkonzentration bei Anwesenheit von DNA ($L/B = 0,05$) bestrahlt wird. Nach jeweils 1, 2, 4, 8, 16, 32 Minuten werden die Lösungen UV-spektrometrisch oder fluorimetrisch vermessen, wobei im Excitationsmaximum der Verbindung angeregt und im Emissionsmaximum gemessen wird. In einem Vorversuch läßt man die Lösungen in den Küvetten im Dunkeln 12 Stunden stehen, um eine mögliche, aber nicht beobachtete Abnahme der Konzentration durch Adsorptionseffekte ausschließen zu können.

Die Auswertung erfolgt durch Auftragung der prozentual noch vorhandenen Extinktion bzw. Fluoreszenz, wobei die Ausgangswerte gleich 100 % gesetzt werden, gegen die Gesamtbestrahlungszeit in Minuten (Abb. 26).

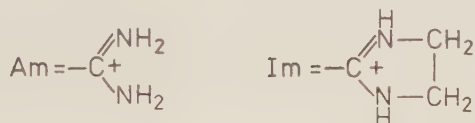
8. Bestimmung der Dampfdruckerniedrigung

In dem auf 45 °C aufgeheizten Dampfdruckosmometer wird mittels einer Spritze je ein auf 45 °C vortemperierter Wassertropfen an die zwei Universal-Meßsonden gehängt, und nach genau 4 Minuten die Anzeige auf Null einjustiert. Anschließend hängt man einen Tropfen der zu messenden vortemperierten Lösung ($c \sim 0,4 \%$) an die eine und abermals Wasser an die andere Sonde und liest nach 4 Minuten den Zeigeraus-
schlag des Meßinstrumentes ab. Anhand der angezeigten Skalenteile kann man die Osmolarität der zu untersuchenden Lösung bestimmen, indem man vorher eine Eichkurve mit NaCl-Lösungen verschiedener Konzentration unter den gleichen Bedingungen aufgenommen hat.

Für die Bestimmung der Dampfdruckerniedrigung danke ich Herrn Dr. H. Hahn und Herrn M. Gillich.

Tabelle 8:

Zusammenstellung der Bindungsparameter der untersuchten Verbindungen an DNA



α = Spezifitätsparameter bei der Verteilung zwischen DNA_{BS} und DNA_{ML}

ϕ_{BS} = Affinitätsparameter für DNA_{BS} (55,5 % AT) in $\text{M}^{-1} \cdot 10^4$

ϕ_{ML} = Affinitätsparameter für DNA_{ML} (27,5 % AT) in $\text{M}^{-1} \cdot 10^4$

K_{app} = apparente Bindungskonstante in $\text{M}^{-1} \cdot 10^5$

n_{app} = apparente Anzahl von Bindungspunkten auf der DNA, die von einem Liganden beansprucht werden

n_{AT} = Anzahl von AT-Paaren als optimale Bindungsstelle auf der DNA

λ_{max} = Wellenlänge des Absorptionsmaximums des Liganden in nm

ϵ = Molarer Extinktionskoeffizient des Liganden in $\text{M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$

a = BPES/SDS

b = Cacodylat/SDS

c = Oktanol-(1)

d = Hexanol-(1)

e = Pentanol-(1)

K = Verteilungskoeffizient

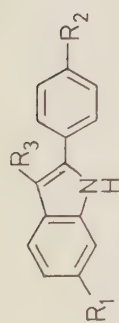
K_o = Oktanol-(1) als Oberphase

K_h = Hexanol-(1) als Oberphase

K_p = Pentanol-(1) als Oberphase

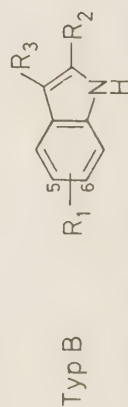
- D = Gleichgewichtsdialyse
V = Differentialverteilungsmethode
A, E = Fluorimetrische Bestimmung des freien Liganden mit
der Anregungswellenlänge A bei der Emissionswellen-
länge E
Ø = keine Bindung festgestellt

Typ A



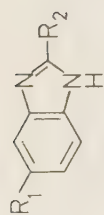
Nr.	R ₁	R ₂	R ₃	α	σ_{BS}	σ_{ML}	K _{appl}	n _{appl}	n _{A,T}	λ_{max}	ϵ	Methode	Synt.-Ref Code-Nr.
1	Am	-H	-H	0,13	2,6	0,37	4,1	15	3	329 ^a	25000 ^a	D	137 271/179
2	Am	Am	-CH=NOH	0,10	14,5	1,4	9,6	7	3-4	336 ^a	16700 ^a	D	137 271/150
3	Am	Am	-H	0,09 0,13	7,7 5,2	7,5 7,4	7,0 4,7	9 9	3-4 3	355 ^a	22700 ^a	D K ₀ =0,094	41 102/198
4	Im	Im	-H	0,12	4,8	5,3	3,0	6	3	363 ^d 367 ^a	21400 ^d 20300 ^a	V K _H =1,25	138 192/188
5	Am	Am	-NH ₂	0,12	1,4	1,6	9,6	7	3	413 ^a	12700 ^a	D	45 225/144
6	Im	Im	-NH ₂	0,10	1,8	1,8	6,7	4	3	426 ^a	14200 ^a	D	139 297/150
7	Am	Am	-NO ₂	0,18	9,8	1,9	5,5	5	2-3	360 ^b 289 ^b	7450 ^b 29100 ^b	D	45 225/135
8	Im	Im	-NO ₂	0,10	6,2	0,62	4,6	7	3	294 ^b	41000 ^b	D	139 297/146
9	Am	-N ^{CH₃} CH ₃	-H	0,25	3,7	0,75	2,9	9	2	375 ^d	28100 ^d	D	140 290/88

Nr	R ₁	R ₂	R ₃	α	σ _{BS}	σ _{ML}	K _{app}	n _{app}	n _{AT}	λ _{max}	ε	Methode	Synt.-Ref. Code-Nr.
10	Im	-N(CH ₃) ₂	-H	0,24	6,4	1,5	5,2	8	2	386 ^a	26900 ^a	D	140 290/86
11	-CH ₂ -NH ₂	-CH ₂ -NH ₂	-H	0,51	1,2	0,75	0,88	7	1	317 ^a	22500 ^a	D	140 290/59
12	Am	-O-C ₆ H ₄ -Am	-H	0,13	-70	8,6	4,7	7	3	337 ^c 344 ^a	26400 ^c 22500 ^a	V K ₀ =4,9	141 186/134
13	Im	-NH-C ₆ H ₃ (NH ₂) ₂ -NH-	-H	0,14	100	14	100	10	3	374 ^c 368 ^b	34100 ^c 28900 ^b	V K ₀ =15,5	142 313/57



14	Am 6	Am	-H	0,10	6,0	0,6	7,6	13	3	308 ^d	28000 ^a	D ⁴²¹ K ₀ =0,005	143 261/115
15	Im 6	Im	-H	0,12	2,6	0,3	3,2	13	3	316 ^d	31200 ^a	D K ₀ =0,012	143 261/116
16	-C(=NOH) ₆ -NH ₂	-C(=NOH)-NH ₂	-H	0	0	0	0	0	0	308 ^d	18800 ^a	D	142 313/24

Nr	R ₁	R ₂	R ₃	α	σ_{BS}	σ_{ML}	K _{app}	η_{app}	η_{AT}	λ_{max}	ϵ	Methode	Synt-Ref Code-Nr.
17	Im 6	-CH ₂ -Im	-H	-0,65	-0,11	-0,08	-	-	1	302 ^a	14600 ^a	D	144 303/29
18	Am 5	Am	-H	0,55	1,65	1,00	1,3	8	1	314 ^a	11800 ^a	D	145 288/100
19	Am 6	Am	-NH ₂	0,10	4,8	0,42	3,8	8	3	388 ^a 323 ^a	5850 ^a 17400 ^a	D K _O =0,0036	142 313/40
20	Am 6	-CH=N-NH-C(=NH) NH ₂	-H	0,19	7,0	1,3	3,2	4-5	2-3	335 ^a	26100 ^a	D	147 313/38
21	Am 6	-CH=N-NH-C(=NH) NH ₂	-NH ₂	0,14	11,0	1,5	6,9	6	3	414 ^a 343 ^a	11100 ^a 17900 ^a	D	146 301/86
22	Am 6	-CH=N-NH-C(=NH) NH ₂	-NO ₂	0,86	10,8	9,5	6,5	6	-	370 ^b	16500 ^b	D	146 301/83
23	Am 6	-CH=N-NH-  -Am	-H	0,19	11,7	24,5	4,5	4	2-3	399 ^a	27400 ^a	D	142 313/37
24	Am 6	-CH=N-NH-  -Am	-NO ₂	0,25	8,3	-19	3,8	4-5	2	441 ^d 448 ^b	35400 ^d 27800 ^b	V K _n =6,45	146 301/87



Typ C

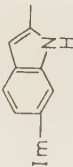
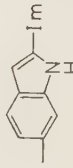
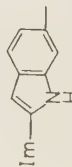
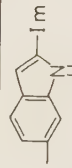
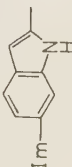
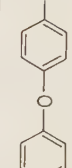
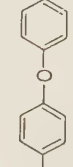
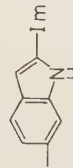
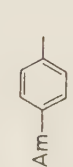
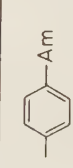
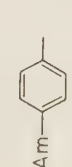
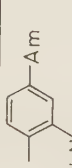
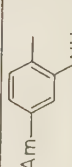
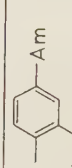
Nr	R ₁	R ₂	α	σ_{BS}	σ_{ML}	K _{app}	n _{app}	n _{AT}	λ_{max}	ϵ	Methode	Synt.-Ref. Code-Nr.
25	Am		0,14	17,5	2,2	16,7	9-10	3	324 ^a	27000 ^d	D	141 131/67a
26	Am		0,11	16,5	1,3	15,0	9	3	337 ^a	34500 ^d	D	147 174/88
27	H		-0,4	-5,7	-2,4	—	—	1	348 ^a	36500 ^d	D	148 317/20
28	Am		0,4	5,0	2,1	3,3	-7	1	349 ^a	29600 ^d	D	149 300/130
29	Im		0,22	16,0	3,3	6,7	4	2	323 ^a	24800 ^d	D	150 316/62
30	Im		0,39	130	58	59	4-5	2-3	A365 E450 344 ^a	31000 ^a	D	150 316/102
31	Im		-0,55	-310	-160	220	7	1	376 ^d 376 ^a	42700 ^d 43600 ^a	V K _H =17,7	150 316/115

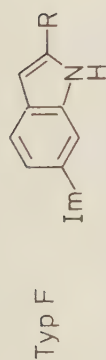


Typ D

Nr	X	Y	Z	R ₁	R ₂	α	σ_{BS}	σ_{ML}	K _{app}	n _{app}	n _{ΔT}	λ_{max}	ϵ	Methode	Synt.-Ref. Code-Nr
32	0	0	CH	Im 5	Im 5'	0,33	7,0	2,7	6,4	9	1-2	384 ^c 382 ^a	56300 ^c 31900 ^a	V K _O =1,1	151 261/96
33	0	0	CH	Am 5	Am 5'	-0,37 -0,40	-3,9 -3,0	-1,8 -1,5	-8,6 -	-20 -	1-2 1-2	381 ^c 380 ^a	40000 ^c 43900 ^a	D V K _O =0,9	151 150/129
34	0	NH	N	Am 5	Am 5'	0,24	15,0	3,7	27	18	2	363 ^b	42400 ^b	D	152 322/17
35	0	NH	CH	Am 5	Am 6'	0,20	9,4	16	110	12	2	385 ^c 383 ^a	47900 ^c 38900 ^a	V K _O =4,9	153 253/50
36	0	NH	CH	Im 5	Im 6'	0,10	98	9,8	110	11	3	390 ^c 389 ^a	35500 ^c 39200 ^a	V K _O =7,9	153 253/152
37	0	NH	C-NH ₂	Im 5	Im 6'	-0,32	-82	-24	-	-	1-2	462 ^e 446 ^a	26200 ^e 28400 ^a	V K _P =4,5	146 301/115
38	NH	NH	CH	Im 6	Im 6'	0,42	600	250	600	10	1	4710 E480 419 ^c 415 ^a	48000 ^c 39300 ^a	V K _O =8,1	154 272/131
39	NH	NH	C-NH ₂	Im 6	Im 6'	-0,31	-420	-120	-420	-10	1-2	465 ^e 455 ^a	32500 ^e 28000 ^a	V K _P =14,1	146 301/101

Type E $R_1-CH=CH-R_2$

Nr	R_1	R_2	α	σ_{BS}	σ_{ML}	K_{app}	n_{app}	$n_{\Delta T}$	λ_{max}	ϵ	Methode	Synt.-Ref. Code-Nr.
40			0,30	260	80	400	15	2	A395 ^c E480 ^c 398 ^c 394 ^a	21500 ^c 18900 ^a	V $K_0=3,9$	145 288/92
41			0,56	12,5	6,9	20	16	1	365 ^c 374 ^a	52800 ^c 45700 ^a	V $K_0=1,8$	145 288/107
42			0,05	135	8	108	8	4	383 ^c 378 ^a	37000 ^c 33000 ^a	V $K_0=1,95$	143 288/3
43			0,05	38	1,4	38	10	4	347 ^c 347 ^a	49800 ^c 44100 ^a	V $K_0=9,7$	145 288/114
44			0,25	2,2	0,5	1,6	7	2	335 ^a	31600 ^a	D	155 Stilbamin
45			0,17	2,75	0,5	2,1	8	2-3	382 ^a	14000 ^a	D	39 314/50
46			0,17	2,6	0,45	2,2	8	2-3	404 ^a	15200 ^a	D	156 314/54



Nr	R	α	ϕ_{BS}	ϕ_{ML}	K _{app}	n_{app}	n_{AT}	λ_{max}	ϵ	Methode	Synt.-Ref. Code-Nr
47		0.52 0.43	121 145	57 66	120 85	-12 -6	1 1	A380 E460 375 ^a 378 ^d	38900 ^a 36500 ^d	D V K _H =4.2	145 288/45
48		0.34	128	42	-135	-10	1-2	A360 E460 357 ^a	19500 ^a	D	150 316/43
49		0.24	500	120	625	-12	2	A400 E460 393 ^c 390 ^a	48800 ^c 41200 ^a	V K _O =2.7	145 288/48
50		-0.5	-2300	-1000	-3800	=17	1	A400 E510 405 ^c 404 ^a	42900 ^c 48400 ^a	V K _O =29.8	143 288/26
51		-0.65	-3400	-1800	—	=8	1	402 ^d 406 ^a	48600 ^d 45300 ^a	V K _H =84.9	157 287/170
52		-0.53	-1500	-850	—	=10	1	394 ^c 392 ^a	38900 ^c 42900 ^a	V K _O =198	150 316/64

L I T E R A T U R V E R Z E I C H N I S

1. M.J. WARING:
Topics in Infectious Diseases, Vol. 1, Drug-Receptor Interactions in Antimicrobial Chemotherapy, ed. J. Drews, F.E. Hahn, Springer Verlag Wien, New York (1975)
2. E.F. GALE, E. CUNDLIFFE, P.E. REYNOLDS, M.H. RICHMOND und M.J. WARING:
The Molecular Basis of Antibiotic Action, John Wiley, London, New York, Sydney, Toronto, second edition (1981)
3. E. HARBERS:
Nucleinsäuren, G. Thieme Verlag, Stuttgart, 2. Auflage (1975)
4. M.J. WARING:
Annu. Rev. Biochem. 50, 159 (1981)
5. H.KERSTEN und W. KERSTEN:
Inhibitors of Nucleic Acid Synthesis in Molecular Biology, Biochemistry and Biophysics, Vol. 18, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York (1974)
6. L. S. LERMAN:
J. Mol. Biol. 3, 18 (1961)
7. W. MÜLLER und D.M. CROTHERS:
Eur.J.Biochem. 54, 267 (1975)
8. Ref. in 2,; W. FULLER und M.J. WARING:
Ber. Bunsenges. Phys. Chem. 68, 805 (1964)
9. W.D. WILSON und R.L. JONES:
Adv. Pharmacol. Chemother. 18, 177 (1981)

10. L. S. LERMAN:
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 49, 94 (1963)
11. S.J. HONG und L.H. PIETTE:
Cancer Res. 36, 1159 (1976)
12. K.E. REINERT:
Biochim. Biophys. Acta 319, 135 (1973)
13. R.L. JONES, A.C. LANIER, R.A. KEEL und W.D. WILSON:
Nucleic Acids Res. 8, 1613 (1980)
14. S.L. HAJDUK:
Prog. Mol. Subcell. Biol. 6, 153 (1978)
15. L.S. LERMAN:
J.Cell. Comp. Physiol. 64 Suppl. 1, 1 (1964)
16. J.B. Le PECQ, M. Le BRET, J. BARBET und B. ROQUES:
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 72, 2915 (1975)
17. W. MÜLLER und D.M. CROTHERS:
J. Mol. Biol. 35, 251 (1968)
18. M. J. WARING:
J. Mol. Biol. 54, 247 (1970)
19. F. ZUNINO, R. GAMBETTA, A.Di MARCO, A. VELCICH, A. ZACCARA,
F. QUADRIFOGLIO und V. CRESCENZI:
Biochim. Biophys. Acta 476, 38 (1977)
20. J.S. LEE und M.J. WARING:
Biochem. J. 173, 115 (1978)
21. L.P. WAKELIN und M.J. WARING:
Biochem.J. 157, 721 (1976)

22. W. MÜLLER:
Symposium über trypanocide fluoreszierende Diamidine in
Erlangen am 19./20. Februar 1982
23. A.K. KREY:
Prog. Mol. Subcell. Biol. 7, 43 (1980)
24. A.S. KRYLOW, S.L. GROKHORSKY, A.S. ZASEDATELEV, A.L. ZHUZE,
G.V. GURSKY und B.P. GOTTIKH:
Nucleic Acids Res. 6, 289 (1979)
25. R.M. WARTELL, J.E. LARSON und R.D. WELLS:
J. Biol. Chem. 249, 6719 (1974)
26. G. LUCK, H. TRIEBEL, M.J. WARING und C. ZIMMER:
Nucleic Acids Res. 1, 503 (1974)
27. H.M. BERMAN, S. NEIDLE, C. ZIMMER und H. THRUM:
Biochim. Biophys. Acta 561, 124 (1979)
28. A. MARXER:
Experientia 23, 173 (1967)
29. C. DAVE, M.J. EHRKE und E. MIHICH:
Chem.-Biol. Interact. 16, 57 (1977)
30. W.A. DENNY und B.F. CAIN:
J. Med. Chem. 22, 1234 (1979)
31. H.G. WILLIAMS-ASHMAN und A. SCHENONE:
Biochem. Biophys. Res. Commun. 1, 288 (1972)
32. A. CORTI, C. DAVE, H.G. WILLIAMS-ASHMAN, E. MIHICH und
A. SCHENONE:
Biochem. J. 139, 351 (1974)

33. G.J. ATWELL und B.F. CAIN:
J. Med. Chem. 11, 295 (1968)
34. B.F. CAIN und G.J. ATWELL:
J. Med. Chem. 19, 1417 (1976)
35. W.A. DENNY, G.J. ATWELL, B.C. BAGULEY und B.F. CAIN:
J. Med. Chem. 22, 134 (1979)
36. R. HIRT und R. BERCHTOLD:
Experientia 17, 418 (1968)
37. L.L. BENNETT:
Prog. Exp. Tumor Res. 7, 259 (1965)
38. J.N. ASHLEY, H.J. BARBER, A.J. EWINS, G. NEWBERY und
A.D.H. SELF:
J. Chem. Soc. 1942, 103
39. J.N. ASHLEY und J.O. HARRIS:
J. Chem. Soc. 1946, 567
40. F.I.C. APTED, in H.W. Mulligan (ed.), The African
Trypanosomiasis, G. Allen and Unwin Ltd., London (1970)
41. O. DANN, G. BERGEN, E. DEMANT und G. VOLZ:
Liebigs Ann. Chem. 749, 68 (1971)
42. G. MINET:
Dissertation Erlangen 1980
43. R.F. MACADAM und J. WILLIAMSON:
Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 66, 897 (1972)
44. G. HARBAUM-NEUHAUS:
Dissertation Erlangen 1980

45. R.R. TIDWELL, J.D. GERATZ, O. DANN, G. VOLZ, D. ZEH und H. LOEWE:
J. Med. Chem. 21, 613 (1978)
46. O. DANN:
Dtsch. Apoth. Ztg. 108, 1595 (1968)
47. H. JENSCH:
Arzneim. Forsch. 5, 634 (1955)
48. S.A. LATT:
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 70, 3395 (1973)
49. B. WEISBLUM und P.L. HASETH:
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 69, 629 (1972)
50. R.R. COWDEN und S.K. CURTIS:
Histochemistry 72, 11 (1981)
51. D.H. WILLIAMSON und D.J. FENNEL:
Methods in Cell Biology, ed. D. Prescott, S. 335-351,
Academic Press, New York (1975)
52. K. GROßGEBAUER, M. KEGEL und O. DANN:
Dtsch. Med. Wochenschr. 101, 1098 (1976)
53. W. SCHNEDL, F. WACHTLER, R. ABRAHAM und O. DANN:
Mikroskopie (Wien) 39, 139 (1982)
54. D. SCHWEIZER:
Hum. Genet. 57, 1 (1981)
55. W. SCHNEDL, A.-V. MIKELSAAR, M. BREITENBACH und O. DANN:
Hum. Genet. 36, 167 (1977)
56. W. MÜLLER, D. M. CROTHERS und M. J. WARING:
Eur. J. Biochem. 39, 223 (1973)
57. E. STEPHIEN, O. DANN, M. FIKUS und K.L. WIERZCHOWSKI:
Stud. Biophys. 67, 135 (1978)

58. E. STEPHIEN, M. FILUTOWICZ und M. FIKUS:
Acta Biochim. Pol. 26, 29 (1979)
59. P. CHANDRA und B. MILDNER:
Cell. Mol. Biol. 25, 137 (1979)
60. J. KAPUŚCINIŃSKI und B. SKOZYLAS:
Nucleic Acids Res. 5, 3775 (1978)
61. M. J. WARING:
J. Mol. Biol. 13, 269 (1965)
62. S. K. SENGUPTA und D. SCHAER:
Biochim. Biophys. Acta 521, 89 (1978)
63. K. MORIKAWA, S. YASUMOTO und M. YANAGIDA:
Nucleic Acids Symp. Ser. 10, 85 (1981)
64. F. ZUNINO, R. GAMBETTA und A. Di MARCO:
Biochem. Biophys. Res. Commun. 69, 744 (1976)
65. V. Du VERNAY, J. A. PACTER und S.T. CROOKE:
Biochemistry 18, 4024 (1979)
66. J. KAPUŚCINIŃSKI und W. SZER:
Nucleic Acids Res. 6, 3519 (1979)
67. J.D. Mc GHEE und P.H. von HIPPEL:
J. Mol. Biol. 86, 469 (1974)
68. I.Z. STEINBERG und H.K. SCHACHMANN:
Biochemistry 5, 3728 (1966)
69. P.H. LLOYD, R.N. PRUTTON und A.R. PEACOCKE:
Biochem. J. 107, 353 (1968)

70. B. FESTY, J. STURM und M. DAUNE:
Biochim. Biophys. Acta 407, 24 (1975)
71. M. HOWE-GRANT und S.J. LIPPARD:
Biochemistry 18, 5762 (1979)
72. J.P. HUMMEL und W.J. DREYER:
Biochim. Biophys. Acta 63, 530 (1962)
73. B.A. NEWTON:
Comparative Biochemistry of Parasites, ed. H. van den
Bosche, S. 127-138, Academic Press, New York, London (1972)
74. W. MÜLLER, I. HATTESOHL, H.J. SCHUETZ und G. MEYER:
Nucleic Acids Res. 9, 95 (1981)
75. L.P.G. WAKELIN, T.S. CREASY und M.J. WARING:
FEBS Lett. 104, 261 (1979)
76. K.F. KUHLMANN, N.J. CHARBENEAU und C.W. MOSHER:
Nucleic Acids Res. 5, 2629 (1978)
77. F. KARUSH:
J. Am. Chem. Soc. 73, 1246 (1951)
78. H.G. HEILWEIL und Q. van WINKLE:
J. Phys. Chem. 59, 939 (1955)
79. L.F. CAVALIERI, A. ANGELOS und M.E. BALIS:
J. Am. Chem. Soc. 73, 4902 (1951)
80. M.J. WARING, L.P.G. WAKELIN und J.S. LEE:
Biochim. Biophys. Acta 407, 200 (1975)
81. P. DAVANLOO und D.M. CROTHERS:
Biochemistry 15, 4433 (1976)

82. N. DATTAGUPTA, M. HOGAN und D.M. CROTHERS:
Biochemistry 19, 5998 (1980)
83. S.A. WINKLE und T.R. KRUGH:
Nucleic Acids Res. 9, 3175 (1981)
84. E.J. GABBAY, D. GRIER, R.E. FINGERLE, R. REIMER,
R. LEVY, S.W. PEARCE und W.D. WILSON:
Biochemistry 15, 2062 (1976)
85. K.R. FOX, R.K. OLSEN und M.J. WARING:
Br. J. Pharmacol. 70, 25 (1980)
86. T.R. KRUGH, S.A. WINKLE und D.E. GRAVES:
Biochem. Biophys. Res. Commun. 98, 317 (1981)
87. Ref in 2.: J. CAIRNS:
Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 27, 311 (1962)
88. D. FREIFELDER:
J. Mol. Biol. 60, 401 (1971)
89. D.J. PATEL:
Eur. J. Biochem. 99, 369 (1979)
90. J. VINOGRAD und J. LEBOWITZ:
J. Gen. Physiol. 49, 103 (1966)
91. M.J. WARING:
Prog. Mol. Subcell. Biol. 2, 216 (1971)
92. W. BAUER und J. VINOGRAD:
J. Mol. Biol. 33, 141 (1968)
93. L.P.G. WAKELIN, M. ROMANOS, T.K. CHEN, D. GLAUBIGER,
E.S. CANELLAKIS und M.J. WARING:
Biochemistry 17, 5057 (1978)

94. R.T. ESPEJO und J. LEBOWITZ:
Anal. Biochem. 72, 95 (1976)
95. R.J. De LEYS und D.A. JACKSON:
Biochem. Biophys. Res. Commun. 69, 446 (1976)
96. J.S. LEE und A.R. MORGAN:
Nucleic Acids Res. 5, 2425 (1978)
97. H. BÜNEMANN, N. DATTA GUPTA, H.J. SCHUETZ und W. MÜLLER:
Biochemistry 20, 2864 (1981)
98. W. MÜLLER und F. GAUTIER:
Eur. J. Biochem. 54, 385 (1975)
99. D.M. JAMES:
Transact. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 72, 471 (1978)
100. Y.O. ALIU und C.N. CHINEME:
Toxicol. Appl. Pharmacol. 53, 196 (1980)
101. W. SCHNEDL:
Privatmitteilung
102. W. MÜLLER:
Privatmitteilung
103. A. ROESCH:
Privatmitteilung
104. A. J. HENRY:
Nature (London) 152, 690 (1943)
105. J.D. FULTON und J.D. DUNITZ:
Nature (London) 160, 161 (1974)

106. J.A. BUTLER, D.W. THOMSON und W.H. MACLENNAN:
J. Chem. Soc. 1933, 674
107. R. COLLANDER:
Acta Chem. Scand. 5, 774 (1951)
108. K. KINOSHITA, H. ISHIKAWA und K. SHINODA:
Bull. Chem. Soc. Jpn. 31, 1081 (1958)
109. J. ANNÉ, E. De CLERCQ, H. EYSEN und O. DANN:
Antimicrob. Agents Chemother. 18, 231 (1980)
110. E. De CLERCQ und O. DANN:
J. Med. Chem. 23, 787 (1980)
111. J. BALZARINI, E. De CLERCQ und O. DANN:
Eur. J. Cancer, in press
112. Division of Cancer Treatment, National Cancer Institute,
Bethesda, Maryland, Privatmitteilung
113. B. F. CAIN, G.J. ATWELL und R.N. SEELYE:
J. Med. Chem. 12, 199 (1969)
114. W.GLUTH:
Dissertation Erlangen 1982
115. M. STEINERT:
Exp. Cell Res. 39, 69
116. Farbwerke Hoechst AG:
Privatmitteilung
117. J. M. BAFORT:
Privatmitteilung
118. E. FINK:
Privatmitteilung

119. H. HAHN:
Privatmitteilung
120. B. FESTY und M. DAUNE:
Biochemistry 12, 4827 (1976)
121. A.W. BRAITHWAITE und B.C. BAGULEY:
Biochemistry 19, 1101 (1980)
122. Ref. in 59: F. QUADRIFOGLIO, V. CRESCENZI und V. GIANCOTTI:
Biophys. Chem. 1, 319 (1974)
123. A. BIERZYŃSKI, G. BOGUTA, K. BERENS und K.L. WIERZCHOWSKI:
Stud. biophys. 67, 57 (1978)
124. M.S. LIN, D.E. COMINGS und O.S. ALFI:
Chromosoma 60,15 (1977)
125. M.V. MIKHAILOV, A.S. ZASEDATELEV, A.S. KRYLOV und
G.V. GURSKII:
Mol. Biol. (Moscow) 15,690 (1981)
126. F. LEUSCHNER:
Privatmitteilung 1979
127. J. Mc CANN, E. CHOI, E. YAMASAKI und B.N. AMES:
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 72, 5135 (1975)
128. G. BALDINI, S. DOGLIA, S. SASSI und G. LUCCHINI:
Int. J. Biol. Macromol. 3, 248 (1981)
129. W. SCHNEDL, R. ABRAHAM, O. DANN, G. GEBER und D. SCHWEIZER:
Hum. Genet. 59, 10 (1981)
130. S.A. LATT und J.C. WOHLLEB:
Chromosoma 52, 297 (1975)

131. D. SCHWEIZER:
Symposium über trypanocide fluoreszierende Diamidine in
Erlangen am 19./20. Februar 1982
132. J. MARMUR:
J. Mol. Biol. 3, 208 (1961)
133. W.MÜLLER, H. BÜNEMANN und N. DATTA GUPTA:
Eur. J. Biochem. 54, 279 (1975)
134. G. FELSENFELD und S.Z. HIRSCHMANN:
J. Mol. Biol. 13, 407 (1965)
135. G. SCATCHARD:
Ann. N. Y. Acad. Sci. 51, 660 (1949)
136. A. SCHOENBERG:
Präparative organische Photochemie, Organische Chemie in
Einzeldarstellungen Bd. 6, Springer Verlag, Berlin,
Göttingen, Heidelberg (1958)
137. W. STICH:
Dissertation Erlangen 1981
138. G. VOLZ:
Laborjournal Nr. 192
139. E. FUCHS:
Laborjournal Nr. 297
140. G. VOLZ:
Laborjournal Nr. 290
141. O. DANN, H. FICK, B. PIETZNER, E. WALKENHORST, R. FERNBACH
und D. ZEH:
Liebigs Ann. Chem. 1975, 160 (1975)

- 142. A. RUMMELT:
Dissertation in Vorbereitung
- 143. J. RUFF:
Dissertation Erlangen 1979
- 144. E. ZIRBS:
Dissertation Erlangen 1983
- 145: J. RUFF:
Laborjournal Nr. 288
- 146: E. BRENGEL:
Dissertation Erlangen 1982
- 147. E. WALKENHORST:
Dissertation Erlangen 1970
- 148. K. H. WIESEMANN:
Dissertation in Vorbereitung
- 149. G. SCHÜRGER:
Dissertation Erlangen 1982
- 150. B. SCHÄFER:
Dissertation in Vorbereitung
- 151. O. DANN, H. CHAR und H. GRIEBMEIER:
Liebigs Ann. Chem. 1982, 1836 (1982)
- 152. A. SCHREPPFER:
Dissertation in Vorbereitung
- 153. H. CHAR:
Dissertation Erlangen 1978

154. R. SCHLEE:
Dissertation Erlangen 1981
155. Ref. C.A. 34 (1940), 4079³:
May & Baker Ltd. (Erf. A. J. Ewins und J. N. Ashley),
Brit. Pat. 510097 (27.7.1939)
156. U. MANN:
Dissertation in Vorbereitung
157. R. HOLZHEID:
Dissertation Erlangen 1982

L E B E N S L A U F

Kolb Reinhard

- 26.01.1955 Geboren in Markt Taschendorf/Mfr. als Sohn
der Eheleute Albrecht Kolb, Techn. Angestell-
ter, und Anni Kolb, geb. Richter, Hausfrau
- 1961-1965 Besuch der Volksschule Markt Taschendorf/Mfr.
- 1965-1974 Besuch des Gymnasiums in Scheinfeld/Mfr.
- 22.6.1974 Abitur
- 10.74-4.75 6 Monate Wehrpflicht
- 4.75-9.79 Studium der Pharmazie an der Friedrich-
Alexander Universität in Erlangen.
- 1.12.1979 Pharmaziepraktikant in der Berolina-Apotheke
- 31.5.1980 in Fürth/Bay.
- ab 1.6.1980 Doktorand und wissenschaftliche Hilfskraft
bei Prof. Dr. O. Dann am Institut für
Pharmazie und Lebensmittelchemie der
Universität Erlangen-Nürnberg
- 8.12.1980 Pharmazeutische Staatsprüfung in München
- 2.2.1981 Approbation als Apotheker
- ab 2.6.1981 Verwalter der Dienstgeschäfte eines
wissenschaftlichen Assistenten.

